

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Camila Eckstein

**POTENCIAL VACINAL DA *Brucella ovis* $\Delta ABCBA$ ENCAPSULADA COM
ALGINATO CONTRA A INFECCÃO POR *Brucella canis* E SUA
INOCUIDADE EM CÃES**

Belo Horizonte - MG
2020

Camila Eckstein

**POTENCIAL VACINAL DA *Brucella ovis* $\Delta ABCBA$ ENCAPSULADA COM
ALGINATO CONTRA A INFECÇÃO POR *Brucella canis* E SUA
INOCUIDADE EM CÃES**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Tatiane A.
Paixão e Dr^a. Juliana P. da Silva Mol

Belo Horizonte - MG
Escola de Veterinária- UFMG
2020

E19p

Eckstein, Camila- 1989.

Potencial vacinal da *Brucella Ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato contra a infecção por *Brucella Canis* e sua inocuidade em cães/ Camila Eckstein – 2020.

93p:il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Coorientadoras: Tatiane A. Paixão

Juliana P. da Silva Mol

Tese de Doutorado apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Cão – Doenças - Teses - 2- Bactéria – Teses - 3 – Vacina – Teses - I – Santos, Renato de Lima - II – Paixão, Tatiane A. – III – Mol, Juliana P. da Silva – IV - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V- Título.

CDD – 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAMILA ECKSTEIN

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Patologia Animal.

Aprovada em 19 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Dr.(a). Renato de Lima Santos
Presidente - Orientador(a)




Dr.(a). Tatiane Alves da Paixão



Dr.(a). Sérgio Costa Oliveira



Dr.(a). Elaine Maria Seles Dorneles



Dr.(a). Ana Patrícia de Carvalho da Silva



Dr.(a) Carlos Rossetti

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Renato de Lima Santos e Prof^a. Tatiane Alves Paixão, por toda dedicação, orientação e conhecimento compartilhado, assim como pela confiança depositada em mim, minha eterna gratidão e reconhecimento.

Aos meus pais Carlito e Anita, minha irmã Caroline, meu agradecimento pela paciência, por suportarem a distância e por sempre me incentivarem a seguir em frente. Ao Fabrício e toda sua família pela paciência, cuidado e dedicação diários, além do incentivo para a conclusão deste trabalho. E ao maior presente que recebi ao longo dessa jornada, a nossa doce Bella, que fez este período de doutoramento ter um maior sentido em minha vida.

Meu agradecimento às mulheres fantásticas que conheci nessa jornada e que hoje são grandes exemplos de profissionais, pessoas e amigas dedicadas: Juliana Mol, Luíze Néli Nunes Garcia, Valéria Spyridion Moustacas e Luciana Fachini da Costa. Em especial à Juliana Mol, que compartilhou comigo seus conhecimentos, seu tempo e sua amizade. Minha eterna gratidão à você Ju.

Aos colegas do laboratório de Patologia Molecular que contribuíram intensamente neste trabalho, Cláudia Rocha, Fabíola Costa, Pâmela Lima, Monique, Thaynara, Daniel, Tatiane Carvalho. Ao Philipe Nunes, excelente profissional e colega, grande exemplo de dedicação e parceria que contribuiu enormemente para a execução deste projeto, além de compartilhar diariamente o conhecimento e os aprendizados adquiridos.

Ao Professores Rodolfo Giunchette e ao doutorando Otoni A. O. Melo Júnior do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do departamento de Ciências Morfológicas do ICB – UFMG. À Professora Marília Melo, pela contribuição e sempre em pronto atendimento para as análises.

Aos colegas doutorandos Ana Flávia Botelho, Ana Luisa Miranda, Matheus Loés Moreira, Leticia Batelli o meu obrigada pela parceria e companheirismo nesta jornada.

Aos professores do departamento de Patologia Veterinária Felipe Pierezan, Rogéria, Natália, Roselene e Roberto que contribuíram grandemente para minha formação profissional e pessoal.

Aos servidores e profissionais da limpeza e segurança do DCCV, sempre presentes e amáveis e que traziam a alegria em cada bom dia.

Meu obrigada à UFMG pela acolhida, e pela oportunidade de doutoramento. À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro para a execução do projeto de pesquisa.

"Mude suas opiniões, mantenha seus princípios. Troque suas folhas, mantenha suas raízes."

(Victor Hugo, 1802-1885)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein, 1879-1955)

“Minha mente é a chave que me liberta.”

(Harry Houdini, 1874-1926)

RESUMO

A brucelose canina é uma doença infectocontagiosa e zoonótica com distribuição mundial. A infecção é causada por *Brucella canis*, bactéria Gram-negativo que resulta em sinais clínicos inespecíficos nos cães e doença crônica debilitante em humanos. A vacinação é principal ferramenta para o controle da brucelose, no entanto, atualmente não existe vacina comercial disponível para o controle da brucelose canina. Este estudo teve como objetivo avaliar a proteção e a resposta imunológica induzida por *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) encapsulada com alginato contra o desafio por *B. canis* em camundongos e avaliar a segurança dessa cepa em cães. A cinética intracelular em macrófagos primários caninos e ovinos foi similar, sendo que as cepas selvagens *B. ovis* e *B. canis* foram capazes de multiplicar no meio intracelular, enquanto a cepa vacinal *Bo* $\Delta abcBA$ apresentou perfil atenuado nestas células. A imunização de camundongos BALB/C com *Bo* $\Delta abcBA$ (10^8 UFC – unidades formadoras de colônia) encapsulada em alginato induziu proliferação de linfócitos, produção de IL-10 e IFN- γ e protegeu contra o desafio experimental com *B. canis*. Cães imunizados com *Bo* $\Delta abcBA$ (10^9 UFC) encapsulada em alginato soroconverteram e não apresentaram alterações hematológicas, bioquímicas ou clínicas. Além disso, *Bo* $\Delta abcBA$ não foi detectada por isolamento ou PCR em amostras de sangue, sêmen, urina ou *swab* vaginal em nenhum momento no decorrer deste estudo. *Bo* $\Delta abcBA$ foi isolado a partir de linfonodos próximos ao local da inoculação em dois cães 22 semanas após a imunização. Desta forma, os resultados mostram que *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato protege camundongos contra o desafio experimental por *B. canis*, e é segura para cães.

Palavras-chave: brucelose canina; vacina; proteção; modelo murino; cão.

ABSTRACT

Canine brucellosis is an infectious and zoonotic disease with worldwide distribution and is considered neglected. The infection is caused by *Brucella canis*, a Gram-negative bacterium that results in unspecific clinical signs in dogs and chronic disease in humans. Vaccination is most important tool for controlling brucellosis, but currently there is no vaccine available for canine brucellosis. This study aimed to evaluate protection and immune response induced by *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) encapsulated with alginate against the challenge with *B. canis* in mice and to assess the safety of this strain for dogs. The intracellular kinetics in primary canine and sheep macrophages was similar, with the wild strains *B. ovis* and *B. canis* being able to multiply in the intracellular medium, while the *Bo* $\Delta abcBA$ vaccine strain showed an attenuated profile in these cells. Immunization of BALB/C mice with alginate-encapsulated *Bo* $\Delta abcBA$ (10^8 CFU – colony forming units) induced lymphocyte proliferation, production of IL10 and IFN- γ , and protected against experimental challenge with *B. canis*. Dogs immunized with alginate-encapsulated *Bo* $\Delta abcBA$ (10^9 CFU) seroconverted, and had no hematologic, biochemic or clinical changes. Furthermore, *Bo* $\Delta abcBA$ was not detected by isolation or PCR with blood, semen, urine samples or vaginal *swabs* at any time point over the course of this study. *Bo* $\Delta abcBA$ was isolated from lymph nodes near to the site of inoculation in two dogs at 22 weeks post immunization. In conclusion, encapsulated *Bo* $\Delta abcBA$ protected mice against experimental *B. canis* infection, and it is safe for dogs.

Keywords: canine brucellosis; vaccine; protection; murine model; dog.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Distribuição mundial da frequência de cães infectados por *B. canis* por país. A frequência de cada país foi obtida por média ponderada da frequência relatada em cada estudo disponíveis no PubMed e Google Acadêmico e em seguida o mapa foi confeccionado utilizando o software Microsoft Excel. Os pontos azuis indicam países com relatos de cães infectados por *B. canis* mas sem estudos de frequência da doença. A tabela contendo as referências e os trabalhos utilizados na confecção do mapa estão inseridos como Anexo (Tabela Suplementar 1).....28

Figura 2. *Heatmap* da frequência da brucelose canina por método de diagnóstico encontrados na literatura referentes ao território brasileiro. Nas cidades em que existe mais de um levantamento epidemiológico foi considerada a média ponderada entre as frequências. As células que aparecem em preto indicam a ausência de trabalhos na literatura utilizando estes métodos de diagnóstico na cidade avaliada. ALT: Aglutinação Lenta em Tubos, IDGA: Imunodifusão em Gel de Agarose, SAR: Soroaglutinação Rápida, ELISA: Ensaio Imunoenzimático, PCR: Reação em cadeia pela polimerase. Os trabalhos utilizados para confecção do *Heatmap* estão descritos na Tabela 1.....32

Figura 3. Distribuição da brucelose canina no território brasileiro. O mapa foi confeccionado em Excel 2016 considerando a média ponderada das frequências obtidas por testes sorológicos realizado em cada Estado. Cada ponto indica o local onde o estudo foi realizado.....33

CAPÍTULO 2

Figura 4. Internalização e multiplicação de *B. ovis* $\Delta abcBA$, *B. ovis* WT e *B. canis* WT em macrófagos primários ovinos (A) e caninos (B). Os macrófagos foram inoculados com *B. ovis*, *B. canis* ou *Bo* $\Delta abcBA$ no MOI de 100 e lisados a 0, 4, 24 e 48 hpi para estimar a internalização intracelular e a multiplicação de bactérias. Os dados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre a cepa mutante *Bo* $\Delta abcBA$ e o tipo selvagem *B. canis* ou *B. ovis* em cada momento do estudo (** p <0,01).....43

Figura 5. Ensaio de proliferação de linfócitos de camundongos BALB/C imunizados com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulado com alginato ou cápsulas de alginato estéril. Os camundongos inoculados com PBS foram utilizados como controle negativo. Após quatro semanas de imunização, os esplenócitos de camundongos (5×10^5) foram estimulados com RPMI, *B. ovis* ou *B. canis* gama irradiados (correspondendo a 108 UFC/poço) por 72 h e a resposta proliferativa foi analisada pelo ensaio MTT. Os dados foram submetidos à ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (***) = p < 0,001; ns = p > 0,05).....44

Figura 6. Produção de IFN- γ (A) e IL-10 (B) por esplenócitos de camundongos imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) ou camundongos inoculados com alginato estéril ou PBS. Quatro semanas após a imunização, os esplenócitos foram recuperados e estimulados com RPMI (controle negativo), *B. ovis* inativado ou *Brucella canis*. Às 72 h após a estimulação, os sobrenadantes foram recuperados e os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA sanduíche específico. A linha pontilhada indica o limite de detecção do teste. Cada ponto de dados

representa média e DP de 6 ou 7 camundongos em duplicata para cada estímulo (**p < 0,001). Os dados foram submetidos à ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (**p < 0,001; ns = p > 0,05).....45

Figura 7. Log de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Brucella canis* por grama de baço de camundongos imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) encapsulada com alginato ou inoculados com PBS e desafiados com *B. canis* (10⁶/camundongos) por via intraperitoneal. Cada ponto representa um camundongo e as barras indicam a média e o desvio padrão de UFC do grupo. As contagens bacterianas foram submetidas à transformação logarítmica e submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias (**p < 0,001). O I.P. (Índice de Proteção) indicado na figura considera a diferença na contagem de UFC entre os grupos inoculados com PBS com o grupo imunizado com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato.....46

Figura 8. Escores histopatológicos de microgranulomas no Baço (A) e trombose, necrose e microgranulomas no fígado (B) de camundongos imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) encapsulada com alginato ou inoculados com PBS e desafiados quatro semanas depois com *B. canis* (10⁶/camundongos). O fígado e o baço foram coletados duas semanas após o desafio. Os escores de lesão são classificados como 0- ausente, 1- discreto, 2- moderado e 3- intenso e comparados entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (p < 0,05; ns= não significativo).....47

Figura 9. Alterações microscópicas representativas no fígado (A) e no baço (B) de camundongos BALB/C desafiados com *Brucella canis*. As setas indicam microgranulomas no fígado e infiltrado inflamatório no baço. Hematoxilina e eosina, 400x. Imunomarcação de *Brucella* sp. No baço de camundongos desafiados com *B. canis* (C). As setas indicam células morfológicamente compatíveis com macrófagos corados positivamente com DAB (1000x).....48

CAPÍTULO 3

Figura 10. Temperatura retal (A) e edemaciação no local da inoculação (B) em cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (Imunizado; n = 5) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (Controle; n = 5). Cada ponto de dados da temperatura retal representa a média e a barra representa a temperatura máxima e mínima. A linha tracejada indica o limite superior da faixa de temperatura considerada normal (39,5°C; Lunn, 2001). Em B, as colunas representam a média da edemaciação em cães imunizados com *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (Imunizado; n = 5) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (Controle; n = 5), e a barra indica o desvio padrão (SD). Os dados foram submetidos à ANOVA, as médias foram comparadas entre grupos em um dado ponto utilizando o teste de comparações múltiplas de Sidak (# = p < 0,05; ### = p < 0,001) ou comparados em um dado ponto com o dia 0 pelo teste de Tukey (* = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).....56

Figura 11. Parâmetros hematológicos de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulados em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). As linhas horizontais indicam o número médio de leucócitos (A), eritrócitos (B), plaquetas (C) e volume corpuscular celular (D), e os valores individuais são indicados por pontos abertos (controle) ou pontos fechados (imunizados). Os valores de referência são indicados por uma linha tracejada (limite superior) e uma linha contínua (limite inferior).....57

Figura 12. Parâmetros bioquímicos das funções hepáticas, renais e pancreáticas de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulado em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). Linhas horizontais indicam o valor médio de ALT (alanina aminotransferase) (A), AST (aspartato aminotransferase) (B), fosfatase alcalina (C), bilirrubina total (D), ureia (E), creatinina (F) e alfa amilase (G) medido por análise colorimétrica. Os valores individuais são representados por pontos abertos para controle e pontos fechados para cães imunizados. Os valores de referência são indicados pela linha tracejada e pela linha continuada (Tabela Suplementar 1).....58

Figura 13. Parâmetros espermáticos de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulados em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). Linhas horizontais tracejadas e contínuas indicam o valor da mediana para o grupo controle e imunizado, respectivamente para os parâmetros de motilidade (A), motilidade progressiva (B) vigor (C) e concentração espermática (D); os valores individuais são indicados por pontos abertos (controle) ou pontos fechados (imunizados).....59

Figura 14. Ausência de alterações microscópicas no (A) Fígado, (B) Baço, (C) Rim, (D) Pulmão, (E) Coração, (F) Próstata, (G) Testículo e (H) Ovário (HE 400x) de cães machos e fêmeas imunizados por via subcutânea com 10^9 UFC de *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato e submetidos à eutanásia 22 semanas após a imunização.....61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Frequência de cães positivos para brucelose canina causada por *Brucella canis* em cidades brasileiras.....29

CAPÍTULO 3

Tabela 2. Sequência de iniciadores utilizados para detecção de *Brucella* spp., *Brucella ovis* e *Bo Δ abcBA* pela PCR55

Tabela 3. Células inflamatórias no ejaculado de cães imunizados com *Brucella ovis abcBA* encapsulados em alginato (imunizado) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). O infiltrado inflamatório foi classificado como 0 (ausente), 1 (discreto- até cinco células por campo), 2 (moderado- de seis a 15 células por campo) e 3 (intenso- acima de 15 células por campo).....60

Tabela 4. Soroconversão de cães imunizados com *Brucella ovis Δ abcBA* encapsulada com alginato (Imunizado) ou inoculados com cápsulas de alginato estéril (Controle), avaliados por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) antes e após a imunização.....62

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

μL - Microlitro

16S- Unidade Ribossomal 16S

2-ME – 2-Mercaptoetanol

AAT- Antígeno Acidificado Tamponado

ACD - Ácido-Citrato-Dextrose

AL- Alagoas

ALT - Alanina aminotransferase

AMOS PCR – Reação em cadeia pela polimerase para diferenciar *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*

ANOVA - Análise de Variância

AST - Aspartato aminotransferase

ATCC- American Type Culture Collection

BA- Bahia

BoΔabcBA– *Brucella ovis* mutante no transportador ABC

BSA – Albumina Sérica Bovina

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CBRA – Conselho Brasileiro de Reprodução Animal

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CO² - Dióxido de carbono

D.P.- Desvio Padrão

DAB - 3, 3'-diaminobenzidina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

ES- Espírito Santo

EUA – Estados Unidos da América

FC – Fixação de Complemento

g- grama

G- Gauge

h- horas

H₂O₂ – Dióxido de Hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HE – Hematoxilina e Eosina

HOOF-Prints PCR

hpi- Horas Após a Infecção

HRM-Alta resolução por fusão

I.P.- Índice de Proteção

IDGA – Imunodifusão em Gel de Ágar

IFN-γ – Interferon Gama

IHQ – Imuno-histoquímica

IL-10 - Interleucina 10

KCl- Cloreto de Potássio

LPS – Lipopolissacarídeo

M- Molar

mg - Micrograma

MG- Minas Gerais
min- minutos
mL- mililitros
mM- MiliMolar
MOI – Multiplicidade da Infecção
MOPS-Ácido morfolinepropanesulfônico
MT- Mato Grosso
MTT - Brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio
N- Normal
Na₂HPO₄- Fosfato Dissódico
NaCl - Cloreto de Sódio
NaH₂PO₄-Fosfato Monossódico
ng- nanograma
nm- Nanômetros
ns- não significativo
OD–Densidade óptica
Omp – Proteínas de membrana externa
PA- Pará
pb – pares de base
PB- Paraíba
PBS – Tampão fosfato salino
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – Potencial de Hidrogênio
PI- Piauí
PR- Paraná
RER – Retículo Endoplasmático Rugoso
RJ- Rio de Janeiro
RN- Rio Grande do Norte
RO- Rondônia
RS- Rio Grande do Sul
RSAT - Teste rápido de aglutinação em lâmina
SE- Sergipe
SFB- Soro Fetal Bovino
SP- São Paulo
T4SS - sistema de secreção tipo IV
TAT - Teste de aglutinação em tubo
TO- Tocantins
Tris-HCl - Tris Cloreto de Hidrogênio
TSA - Ágar triptona de Soja
TSB - Caldo triptona de soja
UFC - Unidade Formadora de Colônia
UI - Unidades Internacionais
VNTR - número variável de repetição em tandem
WT - *Wild Type*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS.....	18
Geral	18
Específicos.....	18
1. CAPÍTULO 1	19
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 Etiologia da brucelose canina	19
1.2 Patogênese da infecção por <i>Brucella</i> spp	19
1.3 Sinais clínicos e tratamento da brucelose canina em cães.....	20
1.4 Diagnóstico da brucelose canina	21
1.5 Epidemiologia da brucelose canina	26
1.6 Infecção de seres humanos por <i>Brucella canis</i>	34
1.7 Controle e prevenção	36
2. CAPÍTULO 2	38
<i>Brucella ovis</i> mutante no transportador ABC protege contra a infecção por <i>Brucella canis</i> no modelo murino	38
2.1 INTRODUÇÃO.....	38
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.2.1 Declarações de ética.....	38
2.2.2 Cepas bacterianas e condições de cultura.....	38
2.2.3 Encapsulamento de <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$	39
2.2.4 Isolamento, cultura e infecção de macrófagos derivados de monócitos ovinos e caninos.....	39
2.2.5 Ensaio de proliferação de linfócitos	40
2.2.6 Resposta de citocinas	41
2.2.7 Ensaio de proteção em camundongos.....	41
2.2.8 Imuno-histoquímica (IHQ).....	42
2.2.9 Histopatologia.....	42
2.2.10 Análise Estatística.....	42
2.3 RESULTADOS	42
2.3.1 <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ é atenuada em macrófagos primários caninos.....	42
2.3.2 Resposta imunológica induzida por <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato em camundongos.....	44
2.3.3 <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato protege contra a infecção por <i>Brucella canis</i>	46
2.4 DISCUSSÃO	48
2.5 CONCLUSÃO	50
3. CAPÍTULO 3	51
<i>Brucella ovis</i> mutante no transportador ABC é segura para cães	51
3.1 INTRODUÇÃO	51
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.2.1 Declarações de Ética	52
3.2.2 Crescimento bacteriano e encapsulamento de <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$	52
3.2.3 Desenho experimental e imunização dos cães	52
3.2.4 Sorologia	53
3.2.5 Isolamento bacteriano	53

3.2.6	<i>Extração de DNA e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)</i>	54
3.2.7	<i>Análise hematológica e bioquímica</i>	55
3.2.8	<i>Avaliação de parâmetros seminais</i>	55
3.2.9	<i>Histopatologia</i>	55
3.2.10	<i>Análise Estatística</i>	55
3.3	RESULTADOS	56
3.3.1	<i>A cepa vacinal <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ não causou alterações clínicas e locais nos cães imunizados</i>	56
3.3.2	<i>A imunização não alterou o perfil hematológico e bioquímico em cães</i>	57
3.3.3	<i><i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ não causa alterações genitais e não é eliminada por cães imunizados</i>	59
3.3.4	<i>Imunização com <i>Brucella ovis</i> $\Delta abcBA$ induziu resposta humoral em cães</i>	62
3.4	DISCUSSÃO	62
3.5	CONCLUSÃO	63
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
5.	ANEXOS	86
6.	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	88

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do gênero *Brucella*, que são capazes de infectar várias espécies animais e o homem (Byndloss e Tsolis, 2016). A brucelose canina, causada pela *Brucella canis*, é uma doença infectocontagiosa e zoonótica negligenciada e que possui dispersão mundial (Carmichael e Kenney, 1968; Kerwin et al., 1992; Holst et al., 2012). É considerada a principal causa de falhas reprodutivas em cães resultando em perdas econômicas significativas para cães comerciais (Gyuranecz et al., 2011; Hofer et al., 2012; Holst et al., 2012). A brucelose canina causada por *B. canis* é caracterizada por acometimento de diversos sistemas com sinais clínicos pouco específicos incluindo alterações reprodutivas como aborto e infertilidade, linfadenite, poliartrite, glomerulonefrite e meningoencefalite (Carmichael e Kenney, 1970; Kerwin et al., 1992). No entanto, não é incomum a ocorrência de animais infectados sem alterações clínicas evidentes (Keid et al., 2017). No homem, a infecção é caracterizada por sintomas inespecíficos como febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e endocardite (Marzetti et al., 2013), o que dificulta o diagnóstico clínico da doença.

O diagnóstico da brucelose canina nos cães é amplamente baseado em métodos indiretos de detecção de anticorpos e possuem limitação na detecção dos animais positivos (Flores-Castro e Segura, 1976; Carmichael e Joubert, 1987; Keid et al., 2017; Mol et al., 2020). O diagnóstico definitivo da infecção por *B. canis* é baseado no isolamento da bactéria em amostras de sangue, sêmen, urina, secreção vaginal e em amostras de placenta ou tecido de fetos abortados (Wanke, 2004). Devido a grande dificuldade de erradicação e controle da doença, algumas estratégias para restringir a disseminação da brucelose canina incluem a eliminação, castração e/ou isolamento dos cães positivos (Carmichael e Shin, 1996), considerando a inexistência de vacina para a brucelose canina.

A infecção de cães por *B. canis* já foi reportada em diversas regiões do mundo como na América do Norte (Brower et al., 2007), América do Sul (Reynes et al., 2012; Keid et al., 2017), Europa (Weber e Schliesser, 1978), Ásia (Katami et al., 1991) e no continente Africano (Adesiyun et al., 1986). No Brasil, levantamentos sorológicos indicam frequência de cães acometidos por *B. canis* variando de 0,84% a 58,3% nos estados brasileiros (Wald e Fernandes, 1976; Vieira et al., 2000; Moraes et al., 2002a; Souza et al., 2002; Ferreira et al., 2003; Almeida et al., 2004; Aguiar et al., 2005; Fernandes et al., 2011; Keid et al., 2017).

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz para o controle da brucelose tem sido o foco de diversos estudos nas últimas décadas, no entanto, os avanços para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz no controle da brucelose animal foram discretos ao longo dos anos e os resultados mais significativos foram obtidos de cepas mutantes atenuadas (Carvalho et al., 2016). Apesar da grande eficácia das vacinas vivas atenuadas já desenvolvidas para o controle da brucelose em ruminantes como a B19, RB51 e Rev-1, o efeito patogênico residual destas cepas para os animais e para o homem é um fator limitante para sua utilização (Banai, 2002; Blasco e Díaz, 1993). Além disso, é importante ressaltar que as vacinas comerciais disponíveis não são indicadas para o controle da brucelose canina nos cães.

Os sistemas transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*) constituem uma família de proteínas com domínios transmembrânicos e são considerados fatores de virulência importantes para o gênero *Brucella* (Rosinha et al., 2002; Silva et al., 2011). Os transportadores ABC atuam nas bactérias exportando toxinas e antibióticos para o meio extracelular e transportam substratos essenciais para a nutrição do organismo para dentro da célula como íons, aminoácidos, peptídeos e ferro (Tam e Saier, 1993; Ko e Splitter, 2003). Após o sequenciamento genético completo da *B. ovis* foi possível a identificação de uma ilha de patogenicidade 1 (BOPI-1) que está ausente nas demais espécies clássicas de *Brucella* e na qual estão contidos

os genes que codificam um sistema ABC transportador (Tsolis et al., 2009; Silva et al., 2011). A deleção do gene que codifica este sistema em *B. ovis* reduz a capacidade de multiplicação da cepa em células HeLa (Silva et al., 2014), bem como em macrófagos ovinos (Macedo et al., 2015), sendo esta cepa também atenuada *in vivo* em camundongos (Silva et al., 2011) e ovinos (Silva et al., 2013). Além disso, *B. ovis* deficiente no sistema ABC transportador é imunogênica (Silva et al., 2013) e protege contra a infecção por *B. ovis* em ovinos (Silva et al., 2015b).

A hipótese deste trabalho considera que a *B. ovis* mutante no transportador ABC encapsulada com alginato protege contra a infecção por *B. canis* no modelo murino e é segura para cães.

A tese apresentada gerou como produtos um manuscrito de revisão de literatura apresentado no capítulo 1 (autores: Camila Eckstein, Renato de Lima Santos, Tatiane Alvez Paixão, Juliana P. Silva Mol e Tayse Domingues de Souza), publicação de artigo científico com dados originais constituído pelos capítulos 2 e 3 (Anexo 1), e depósito de adição de patente intitulada “COMPOSIÇÃO VACINAL PARA PREVENÇÃO DE BRUCELOSE CANINA E USO” (Anexo 2).

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o potencial de proteção da cepa mutante *BoΔabcBA* contra a infecção por *B. canis* em camundongos e a inocuidade desta cepa vacinal para sua utilização em cães.

Específicos

- Avaliar a capacidade de invasão e sobrevivência da cepa *BoΔabcBA* em macrófagos caninos e ovinos.
- Avaliar a resposta imunológica celular e produção de citocinas em esplenócitos de camundongos imunizados com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato, cápsulas estéreis de alginato e PBS.
- Avaliar a proteção conferida por *BoΔabcBA* encapsulada com alginato em camundongos desafiados com *B. canis*.
- Avaliar a eliminação da cepa mutante *BoΔabcBA* em amostras de sangue, urina, sêmen e swab vaginal caninos por meio de isolamento bacteriano e detecção molecular por PCR.
- Avaliar a ocorrência de alterações clínicas como febre e edemaciação no local da inoculação em cães imunizados com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato.
- Avaliar a toxicidade da *BoΔabcBA* encapsulada com alginato em cães através da avaliação de perfil bioquímico e hematológico.
- Avaliar a soroconversão de cães imunizados com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato.
- Avaliar a ocorrência de alterações anatomopatológicas em cães imunizados com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato.

1. CAPÍTULO 1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Etiologia da brucelose canina

A brucelose canina é uma doença infectocontagiosa zoonótica inicialmente descrita na década de 60, após a ocorrência de surtos de aborto em canis norte-americanos (Carmichael, 1966). Após investigações de tecidos placentários e fetais oriundos dos abortos, foi isolado um organismo cocoide, Gram-negativo, com características que se assemelhavam a bactérias do gênero *Brucella*, a qual posteriormente foi classificada como *B. canis* (Carmichael, 1966).

Além da infecção em cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e seres humanos (Carmichael e Kenney, 1968; Carmichael e Joubert, 1987), evidências sorológicas da infecção natural de canídeos silvestres por *B. canis* já foi relatada em raposas (*Vulpes macrotis mutica* e *Lycalopex vetulus*), coiotes (*Canis latrans*), gambás (*Didelphis virginiana*), guaxinis (*Procyon lotor*), quatis (*Nasua nasua*), gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) e Irara (*Eira barbara*) (Randhawa et al., 1977; McCue e O'Farrell, 1988; Oliveira-Filho et al., 2012). A infecção por *B. canis* em animais domésticos de produção é incomum, no entanto, a infecção já foi constatada em bovinos resultando em aborto em um rebanho da Coreia (Baek et al., 2003).

Para as demais espécies animais não existem relatos da infecção natural por *B. canis*, apesar de estudos demonstrarem a susceptibilidade de chimpanzés (*Pan troglodytes*), macaco da cauda curta (*Macaca arctoides*), macaco rhesus (*Macaca mulata*), camundongos, coelhos e cobaias à infecção experimental (Gyuranecz et al., 2011; Silva et al., 2011; Chacón-Díaz et al., 2015). Em felinos domésticos (*Felis catus*) infectados experimentalmente com *B. canis* ocorre a disseminação do agente que foi detectado no baço e linfonodos, embora esta espécie seja considerada resistente à infecção experimental (Tolari et al., 1982).

1.2 Patogênese da infecção por *Brucella* spp.

Os mecanismos moleculares de patogênese são altamente conservados entre as diferentes espécies do gênero *Brucella*. Assim, as informações aqui descritas são afirmativas comuns ao gênero, não somente à *B. canis*.

As vias de infecção por *Brucella* spp. mais comuns são as mucosas digestória ou respiratória. Uma etapa fundamental para o estabelecimento da infecção é sua capacidade de atravessar epitélios intestinais intactos, particularmente através das células M, de maneira completamente furtiva, sem ativar a resposta imunológica inata do hospedeiro (Paixão et al., 2009). O sistema regulador de dois componentes BvrR/BvrS é necessário para a invasão e vigilância em células fagocíticas e não fagocíticas recrutando GTPases, particularmente Cdc42 (López-Goñi et al., 2002; Rosseti et al., 2013). Este sistema está relacionado com a adesão e invasão bacteriana (Sola-Landa et al., 1998), regulando proteínas de membrana como Omp25 e Omp22 que conferem resistência à fagocitose (Manterola et al., 2005), além de reduzir a multiplicação e sobrevivência da bactéria em células trofoblásticas e fagocíticas (Edmonds et al., 2001; Manterola et al., 2005).

O lipopolissacarídeo (LPS) também é considerado um importante fator de virulência de *Brucella* spp. (Lapaque et al., 2005). Curiosamente, as cepas de *Brucella* spp. com LPS naturalmente rugoso (devido à redução ou ausência do polissacarídeo O) tendem a invadir as células hospedeiras com mais eficiência do que as cepas lisas, mas têm menor capacidade de sobrevivência nas células hospedeiras em cultura ou *in vivo* (Allen et al., 1998; Jimenez de Bagues et al., 2004). O LPS liso é protetor contra vários mecanismos bactericidas do hospedeiro, incluindo peptídeos antimicrobianos, óxido nítrico e radicais livres (Lapaque et al., 2005). Estudos anteriores identificaram o sistema de secreção do tipo IV (SST4) codificado pelo

operon *virB* (SST4), essencial para a sobrevivência e persistência intracelular *in vivo* (O'Callaghan et al., 1999; Hong et al., 2000). Este sistema transloca proteínas efetoras bacterianas diretamente no citosol da célula hospedeira. Na ausência de um SST4 funcional, *Brucella* não é capaz de direcionar o tráfego intracelular do vacúolo contendo *Brucella* em direção ao retículo endoplasmático rugoso (RER), que constitui o nicho replicativo intracelular de *Brucella* (Celli et al., 2003).

Como mencionado acima, a maioria dos estudos sobre a patogênese de *Brucella* não envolve *B. canis* especificamente. No entanto algumas particularidades da patogênese desta espécie de *Brucella* já foram descritas. Entre elas, que a infecção por *B. canis* induz menor produção de IFN- γ quando comparada com a infecção por *B. abortus* (Chacón-Díaz et al., 2015). Em fetos e neotatos caninos naturalmente infectados por *B. canis* ocorre disseminação pantrópica da bactéria, a qual pode ser detectada em tecidos como estômago, intestinos, rins, sistema nervoso, cordão umbilical, fígado, baço, linfonodos e pulmão (Souza et al., 2018). No modelo murino as lesões histológicas causadas por *B. canis* consistem na infiltração de histiócitos e neutrófilos, comumente levando a formação de granulomas, com áreas de necrose (Stranahan et al., 2019). No entanto, quando comparadas as espécies lisas de *Brucella*, são necessários 2 Log a mais de *B. canis* (10^7) para o estabelecimento da infecção no modelo murino (Stranahan et al., 2019).

1.3 Sinais clínicos e tratamento da brucelose canina em cães

A literatura descreve o aborto como um dos principais sinais clínicos da brucelose canina (Carmichael, 1966). No entanto, sabidamente, mais de 50% de cães infectados por *B. canis* são assintomáticos (Keid et al. 2017). Em casos de fêmeas sintomáticas, o aborto pode ocorrer na fase inicial da gestação, resultando em reabsorção embrionária que pode ser facilmente confundida como falha de concepção (Carmichael e Kenney, 1968; Wanke, 2004), ou no terço final entre 45 e 55 dias de gestação (Carmichael, 1966; Carmichael e Kenney, 1968).

A ocorrência de falhas de concepção também foi associada à infecção por *B. canis* (Moore e Gupta, 1970). Ocorrência de abortos repetidos e consecutivos, ou alternados com parto normal, podem ocorrer em fêmeas infectadas, que geralmente não apresentam outros sinais clínicos a não ser o relato de apatia (Carmichael e Kenney, 1968). A descarga vaginal é comum após o aborto e pode ter duração variável (de 1 a 6 semanas), e aparência geralmente serossanguínea, mas que pode variar de verde viscoso a acinzentado (Carmichael e Kenney, 1968; Holst et al., 2012). Apesar da associação comum entre a ocorrência de aborto com a brucelose canina, recentemente Souza et al.(2018) demonstraram que a brucelose pode ser uma doença silenciosa em cães adultos e com tropismo inespecífico em tecidos de neonatos e natimortos.

A ocorrência de natimortos, a morte neonatal e o nascimento de filhotes fracos são frequentemente associados à infecção por *B. canis*, bem como filhotes vivos infectados e aparentemente saudáveis, na mesma ninhada (Carmichael e Kenney, 1968; Moore e Gupta, 1970; Gyuranecz et al. 2011; Souza et al., 2018). Os filhotes sobreviventes infectados são um reservatório importante da bactéria, bem como de grande importância na transmissão para o homem (Lucero et al., 2010a; Dentinger et al., 2015) e papel na manutenção da bactéria na população canina (Gyuranecz et al., 2011).

Embora a bacteremia possa persistir por vários meses, a febre não é uma característica clínica típica em cães naturalmente ou experimentalmente infectados por *B. canis*. A ocorrência de aborto e natimortos é comumente observada em populações que apresentaram o primeiro contato com a bactéria. Em canis com histórico da infecção, as falhas reprodutivas ocorrem de forma esporádica.

Achados clínicos observados em cães são muito variáveis. O aumento dos linfonodos tem sido relatado como alteração clínica presente e com persistência prolongada. A afecção dos testículos e epidídimos pode resultar em aumento de consistência e volume e aumento de sensibilidade dolorosa à palpação, e dermatite escrotal por lambedura (Carmichael e Kenney, 1968; Moore e Kakuk, 1969; Makloski, 2011). Pequenos abscessos testiculares e aumento da próstata devido a prostatite com compressão pélvica podem ser visualizados por ultrassonografia (Makloski, 2011). A perda de libido e a infertilidade foram relatadas em cães machos infectados por *B. canis* (Carmichael e Kenney, 1968). O sêmen de cães infectados pode apresentar defeitos espermáticos e aglutinação entre cabeças de espermatozóides. Cães infectados cronicamente podem ser oligospermicos ou azoospermicos (George et al., 1979).

Outros sinais clínicos comuns em cães infectados incluem artrite, doença ocular, discoespondilite, retenção urinária (Makloski, 2011) e osteomielite (Smeak et al., 1987). A discoespondilite é o distúrbio ortopédico mais comum atribuído à infecção por *B. canis* em cães. Nesses casos, dores nas costas, claudicação e déficits neurológicos podem estar presentes. A radiografia auxilia na detecção da discoespondilite o diagnóstico diferencial para outros agentes infecciosos exige sorologia e/ou isolamento do agente (Henderson et al., 1974; Kornegay e Barber, 1980; Anderson e Binnington, 1983; Thomas, 2000; Forbes et al., 2019).

Lesões oculares associadas à infecção por *B. canis* foram relatadas e tratadas com sucesso em cães adultos castrados. As lesões oculares foram a queixa exclusiva em três cães saudáveis que apresentaram blefaroespasma recorrente e uveíte com hiperpigmentação da superfície iridiana, miose, sinéquias, opacificação e pigmentação da cápsula da lente, lesões retinianas, opacidade vítrea e hiperemia do disco óptico (Ledbetter et al., 2009).

Em cães, o tratamento com antibióticos não é incentivado, principalmente devido às altas taxas de recidiva, e a cura é incerta após o tratamento com antibióticos, resultando em alto risco de transmissão para seres humanos e outros cães (Holst et al., 2012; Cosford, 2018). Além disso, o custo do tratamento com antibióticos em cães geralmente é alto e prolongado e, ocasionalmente, não é definitivo para resolver a infecção, exigindo o tratamento com outros antibióticos, que podem ser proibitivos para alguns proprietários (Zoha e Walsh, 1982). É importante ressaltar que a antibioticoterapia não erradica o organismo do cão, portanto, a ausência dos sinais clínicos após o tratamento não indica a ausência da bactéria do organismo (Johnson et al., 1982).

1.4 Diagnóstico da brucelose canina

A manifestação de sinais clínicos compatíveis com a brucelose canina é comumente a principal estratégia utilizada para o estabelecimento da suspeita da doença. Juntamente com os sinais clínicos apresentados, o histórico clínico e reprodutivo do animal e do canil permitem rastrear o possível momento da infecção, e os demais animais possivelmente infectados (Krueger et al., 2014; Dentinger et al., 2015). Um dos grandes entraves no diagnóstico clínico é a alta frequência de cães assintomáticos, que pode ultrapassar 50% (Keid et al., 2017). Desta forma, ferramentas complementares de diagnóstico direto e indireto são essenciais para a detecção dos cães positivos.

O padrão ouro para o diagnóstico da brucelose canina é o isolamento bacteriano, o qual evidencia a presença da bactéria viável. Usualmente são utilizadas amostras de sangue, sêmen, urina, *swab* vaginal, tecidos fetais e placentários, ou mesmo coágulos sanguíneos e amostras de soro (Carmichael e Shin, 1996; Keid et al., 2017). O isolamento bacteriano possui alta especificidade, no entanto, possui baixa sensibilidade considerando fatores como a eliminação intermitente da bactéria e amostragem (método de coleta, conservação do tecido, armazenamento).

Assim como outras espécies de *Brucella* spp., a bactéria cresce bem sob condições aeróbicas em meios convencionais, como dextrose ou ágar triptona de soja. No entanto, considerando seu potencial zoonótico, esse procedimento apresenta um risco considerável para o manipulador no laboratório (Godoy et al., 1979; Wallach et al., 2004; Sam et al., 2012). Desta forma, o isolamento bacteriano de *B. canis* deve ser realizado sob condições de nível 3 de biossegurança (Teixeira e Valle, 1996).

Na ausência de amostras de fetos abortados ou secreções vaginais, o sangue total é a amostra de escolha para o isolamento de *B. canis*. Em contraste com outras espécies de *Brucella* spp., a infecção por *B. canis* está associada a bacteremia que persiste por 2 a 4 semanas, atingindo até 10^4 UFC/mL no sangue (Carmichael e Greene, 1990; Wanke, 2004; Hollett 2006). A cultura bacteriana pode ser realizada por método direto ou indireto. O método direto consiste na cultura direta de amostras de sangue em meio sólido a 37°C sem CO₂ por 4 a 7 dias. O método indireto consiste em inocular uma amostra de sangue previamente congelada a -20°C no meio líquido, incubar a 37°C sem CO₂ por pelo menos 6 dias e subsequente inoculação em meio sólido nas mesmas condições (37°C, sem CO₂, 4-7 dias) (Alton et al., 1975). É importante ressaltar que, independentemente do método empregado, o isolamento de *B. canis* tem baixa sensibilidade, geralmente resultando em resultados falso-negativos. Alguns fatores podem diminuir ainda mais a sensibilidade intrinsecamente baixa do isolamento, incluindo: (i) tratamento antimicrobiano; (ii) uso de EDTA, que inibe o crescimento bacteriano (heparina ou citrato de sódio deve ser usado como anticoagulante); (iii) condições inadequadas para armazenamento e transporte de amostras (Carmichael, 1998; Poester et al., 2010). Portanto, métodos de diagnóstico adicionais são sempre recomendados (Alton et al., 1975, Poester et al., 2010).

Além do sangue, outras amostras são muito úteis para o isolamento de *B. canis*. As secreções vaginais e uterinas devem ser coletadas durante o proestro e/ou estro, quando há um risco aumentado de bacteremia, ou após a ocorrência de aborto (Greene e Carmichael, 2012). Amostras de membranas fetais, fetos abortados e natimortos devem ser cultivadas quando disponíveis, pois essas amostras geralmente contêm altas cargas bacterianas. As amostras de sêmen também devem ser submetidas à cultura, principalmente entre 3 e 11 semanas após a infecção, quando quantidades maiores de bactérias são eliminadas no sêmen. Após esse período, a eliminação de *B. canis* no sêmen torna-se intermitente com baixas concentrações e, portanto, as culturas são frequentemente negativas (Carmichael, 1990; Carmichael e Greene, 1998). As amostras de urina também são úteis para isolamento, principalmente entre 8 a 30 semanas após a infecção. As concentrações de *B. canis* na urina variam de 10 a 10^2 UFC/mL, e a cistocentese é o método de escolha para evitar a contaminação (Carmichael e Greene, 1990; Greene e Carmichael, 2012). Nos casos de uveíte induzida por *B. canis*, o humor aquoso é uma amostra de escolha para a cultura, enquanto os casos de doença articular aspirados por medula óssea são amostras de escolha (Johnson e Walker, 1992; Fernandes et al., 2011; Greene e Carmichael, 2012). Em casos de necropsia de fetos, neonatos e natimortos, devem ser coletadas amostras de diferentes tecidos, especialmente linfonodos, rim, baço, fígado e órgãos genitais para o isolamento bacteriana, devido à inespecificidade do tropismo por *B. canis* (Souza et al., 2018).

Colônias isoladas com morfologia compatível com *Brucella* devem ser submetidas a ensaios bioquímicos para confirmar o gênero e a espécie. Devido ao seu fenótipo de lipopolissacarídeo rugoso (LPS), possui características bioquímicas diferentes de *Brucella* spp. que possuem LPS liso (Alton et al., 1975; Poester et al., 2010; Mol et al., 2012).

Outros métodos de detecção direta de *B. canis* podem ser utilizados como: reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Fernandes et al., 2013), AMOS PCR, Bruce- Ladder e eletroforese de campo pulsante (Baek et al., 2003; Magalhães et al., 2005; Brower et al., 2007).

No entanto, a detecção de fragmentos de DNA pela PCR não indica a presença da bactéria viva, enquanto as demais técnicas requerem a utilização de DNA de colônias puras obtidas por isolamento para a obtenção de resultados satisfatórios, o que restringe a utilização destas técnicas (Baek et al., 2003; Magalhães et al., 2005; Brower et al., 2007).

A PCR tem como vantagens a obtenção de resultados mais rápidos, além de não ser afetada pela viabilidade bacteriana e contaminação das amostras com outras bactérias (Bricker, 2002; Navarro et al., 2004). O sangue total é a amostra de escolha para a PCR, enquanto o soro também pode ser usado, mas resulta em menor sensibilidade (Keid et al., 2010). A extração de DNA a partir de amostras de sangue deve ser realizada com protocolos apropriados para remover inibidores da PCR (LealKlevezas et al., 1995; Morata et al., 1998; Keid et al., 2007c). É importante ressaltar que a ausência de bacteremia, o uso de drogas antimicrobianas e as amostras de sangue com heparina, que é um inibidor da PCR, também podem influenciar o resultado. Amostras de sêmen e tecido também podem ser empregadas para PCR (Greene e Carmichael, 2012).

A PCR usada rotineiramente para o diagnóstico de brucelose canina utiliza sequência específica do gênero conservada entre as espécies de *Brucella*, como o gene *bcs31* (Baily et al., 1992), da subunidade ribossomal 16S (Herman e Ridder, 1992; Romero et al., 1995) e *recA* (Scholz et al., 2008). A PCR direcionada a esses genes pode ser realizada com DNA extraído de isolados ou amostras clínicas.

PCR multiplex espécie-específico também pode ser usada no diagnóstico da brucelose canina, contudo por requerer DNA bacteriano purificado e obtido de isolados, não é aplicável a amostras clínicas. Além disso, essas são técnicas caras e trabalhosas. Essas técnicas incluem o Bruce-Ladder, que é baseado na detecção de IS711 e nove outros genes, sendo capaz de diferenciar *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 e *B. melitensis* Rev 1, mas não diferencia biótipos dentro das espécies (LópezGoñi et al., 2008 ; López-Goñi et al., 2011; Kang et al., 2011). A PCR de Suis-Ladder é uma modificação do Bruce-Ladder, e é capaz de identificar os biótipos 1, 2, 3, 4 e 5 de *B. suis*, bem como o *B. canis* (López-Goñi et al., 2011). O HOO-Prints PCR é baseado em oito VNTR (número variável de repetição em tandem) e distingue a maior parte de *Brucella* spp., incluindo *B. canis* (Bricker et al., 2003; Bricker e Ewald, 2005). A PCR quantitativa em tempo real baseada na análise de polimorfismo da curva de melt de alta resolução (MAR) dos genes *bcs31* e 16S ribossomal, permite a identificação do gênero *Brucella* e, em alguns casos, da espécie, mas atualmente essa técnica está restrita ao diagnóstico de brucelose humana e avaliação da eficácia do tratamento (Queipo-Ortuño et al., 2005; Kattar et al., 2007; Gopaul et al., 2008; Hinic et al., 2008; Queipo-Ortuño et al., 2008; Bounaadja et al., 2009; Winchell et al., 2010).

O desenvolvimento da reação de PCR simples específica de *B. canis* é difícil devido a alta conservação do genoma entre as espécies de *Brucella* spp. Uma reação de PCR específica para *B. canis* foi desenvolvida com base na detecção de produto com 300 pb na região BCAN B0548 de *B. canis* (Kang et al., 2014). No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a sensibilidade e a especificidade desse protocolo em amostras clínicas.

Os diferentes métodos de diagnóstico possuem características intrínsecas aos testes. No entanto, grande variação de sensibilidade e especificidade são observadas, especialmente entre métodos diretos e indiretos. Para a triagem dos cães positivos, comumente são aplicados métodos sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Brucella* (Carmichael e Shin, 1996).

Métodos sorológicos de diagnóstico como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), aglutinação lenta em tubo, aglutinação em placa, soroaglutinação rápida têm sido utilizados para o diagnóstico de cães (Carmichael e Joubert, 1987; Carmichael e Shin, 1996; Keid et al.,

2017). Podem ser utilizados antígenos de *B. ovis* ou *B. canis*, no entanto, a utilização de antígenos de *B. canis* é indicada por aumentar a especificidade da técnica, reduzindo a ocorrência de falsos-positivos. Atualmente, os antígenos de *B. canis* não são comercializados, o que restringe a utilização da técnica.

B. canis é sorologicamente distinta de *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, que são espécies portadoras de LPS liso e, portanto, seus antígenos não reagem com anti-*B. canis* (Alton et al., 1975). Os testes sorológicos utilizados com mais frequência para o diagnóstico de infecção por *B. canis* incluem: o teste rápido de aglutinação em lâmina - RSAT (George e Carmichael, 1974), o teste rápido de aglutinação em lâminas com 2mercaptoetanol - 2ME-RSAT (Badakhsh et al., 1982) e o teste de imunodifusão em gel de ágar - IDGA (Myers et al., 1972). Esses testes detectam anticorpos contra antígenos de superfície de *Brucella*, particularmente anticorpos contra LPS bruto. Resultados falso-positivos são comuns, devido à reação cruzada com outras bactérias, como *Pseudomonas*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* (Badakhsh et al., 1982; Carmichael e Joubert, 1987; Carmichael e Greene, 1990; Mateu-de-Antonio et al., 1993; Wanke, 2004; Nielsen et al., 2007; Bounaadja et al., 2009).

Independente do método sorológico empregado, resultados negativos são comumente observados durante as primeiras 3 a 4 semanas após a infecção, mesmo quando a bacteremia está presente. Portanto, os cães devem ser testados pelo menos duas vezes com intervalos de 30 dias. Os cães permanecem sorologicamente positivos por 8 a 12 semanas após a infecção (Greene e Carmichael, 2012). As amostras de soro devem ser preferencialmente obtidas de cadelas no proestro, estro ou durante a gestação ou imediatamente após o aborto (Greene e Carmichael, 2012). As amostras de soro devem estar livres de hemólise, pois a hemoglobina pode resultar em aglutinação e, conseqüentemente, resultados falso-positivos (Badakhsh et al., 1982).

O teste de aglutinação rápida em lâmina (RSAT) e o 2-mercaptoetanol -RSAT (2ME-RSAT) são testes sorológicos comumente usados para o rastreamento da infecção por *B. canis*. Esses testes são rápidos, baratos, sensíveis e permitem diagnóstico precoce (3 a 4 semanas após a infecção). Um resultado negativo nesses testes está associado à ausência de infecção em 99% dos casos (Carmichael e Greene, 1998; Greene e Carmichael, 2012). Para o RSAT, o antígeno *B. ovis* é corado com Rosa bengala e o método possui sensibilidade de 81,25% (Greene e Carmichael, 2012). É importante ressaltar que o RSAT pode ser realizado com soros hemolisados, pois não há interferência no resultado (Badakhsh et al., 1982). O 2ME-RSAT é um teste confirmatório que evita resultados falso-positivos (Johnson e Walker, 1992; Carmichael e Shin, 1996; Greene e Carmichael, 2012). Além disso, o uso de cepas não mucoides de *B. canis* para a preparação de antígenos também pode diminuir os resultados falsos positivos (Damp et al., 1973; Alton et al., 1975; Greene e Carmichael, 2012).

O teste de aglutinação em tubo (TAT) também é empregado como teste confirmatório para RSAT ou 2ME-RSAT e é considerado semiquantitativo, pois permite a avaliação dos títulos de anticorpos. Títulos abaixo de 1:50 são considerados negativos, entre 1:50 e 1:100 são considerados suspeitos e devem ser testados novamente após 30 dias, enquanto cães com títulos iguais ou superiores a 1:200 são considerados positivos (George e Carmichael, 1984; Carmichael e Greene, 1998; Greene e Carmichael, 2012), embora resultados falso-positivos ou falso-negativos não sejam incomuns (Carmichael, 1998; Keid et al., 2009).

O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi originalmente descrito por Myers e Siniuk (1970), é baseado na detecção de precipitinas em soros de cães de 5 a 10 semanas após a infecção (Carmichael e Greene, 1993). O IDGA é baseado em proteínas de superfície como antígeno e é capaz de detectar precipitinas entre 5 e 10 semanas após a infecção. No entanto, este método apresenta desvantagens importantes, incluindo reações cruzadas e subjetividade

para a interpretação de linhas de precipitação (Lucero et al., 2002). Além de antígenos superficiais, antígenos citoplasmáticos também podem ser usados para o IDGA, resultando em um teste altamente específico para *Brucella* spp. uma vez que antígenos citoplasmáticos são conservados apenas em organismos pertencentes ao gênero *Brucella*. Neste caso, os antígenos citoplasmáticos obtidos por sonicação de *B. canis* permitem a detecção de anticorpos em cães infectados cronicamente, mesmo três anos após a infecção na ausência de bacteremia. No entanto, em infecções agudas, o IDGA a base de antígeno citoplasmático tende a detectar precipitinas em estágios posteriores da infecção, quando comparado ao IDGA à base de antígeno de superfície (Johnson e Walker, 1992; Carmichael, 1998; Carmichael e Greene, 1998). Considerando que os antígenos citoplasmáticos são conservados entre *Brucella* spp., a infecção por qualquer espécie que não seja *B. canis* deve ser considerada no diagnóstico diferencial (Greene e Carmichael, 2012), caso em que o teste do antígeno acidificado tamponado (utilizado para diagnóstico de espécies lisas de *Brucella*) é útil para diferenciar *B. canis* de *Brucella* com LPS liso.

Vários protocolos de ensaios imunoenzimáticos foram aplicados ao diagnóstico da infecção por *B. canis*, mas a sensibilidade e a especificidade variam de acordo com o antígeno utilizado (Johnson e Walker, 1992; Mateu-de-Antonio et al., 1993; Baldi et al., 1994; Baldi et al., 1997; Lucero et al., 2002; Oliveira et al., 2011). Os antígenos empregados nos protocolos ELISA incluem: antígenos de superfície de *B. canis* (Serikawa e Muraguchi, 1979), antígenos citoplasmáticos (Baldi et al., 1994) e antígenos extraídos de *B. canis* não mucoide (variante M-) por solução salina aquecida (HSS) (Mateu-de-Antonio et al., 1993). O ELISA indireto é considerado mais específico, mas menos sensível que o TAT para a triagem (Carmichael e Greene, 1998). Entretanto, esse método é mais sensível que os métodos de aglutinação e IDGA (Johnson e Walker, 1992; Wanke et al., 2002; Wanke, 2004). Além disso, as análises imunoenzimáticas (ELISA) podem detectar anticorpos em cães infectados cronicamente que apresentam resultados negativos por 2ME-RSAT e IDGA (Wanke et al., 2012), podendo ser aplicado como teste confirmatório (Lucero et al., 2002; Ebani et al., 2003; Barkha et al., 2011).

O teste de fixação do complemento (FC) é considerado um teste confirmatório para a infecção por *B. ovis* e *B. abortus* (Worthington et al., 1985; Mathias et al., 1991; Hilbink et al., 1993; Estein, 1999). Embora tenha alta especificidade e sensibilidade, a FC não tem sido rotineiramente usada para o diagnóstico de brucelose canina (Azevedo et al., 2004).

Ensaio imunocromatográfico foram desenvolvidos para o diagnóstico de infecções por *B. canis* (Kim et al., 2007; Wanke et al., 2012; Keid et al., 2015). Atualmente, os resultados disponíveis indicam ser um método simples e rápido e, portanto, adequado para aplicações clínicas. Podem ser empregadas amostras de sangue total, plasma ou soro (FASTest *Brucella* c., Megacor, Horbranz, Austria; AntigenRapid Canine *Brucella* Ab Test, Bioeasy, Coreia do Sul; ImmunoComb: Canine *Brucella* Ab. Test Kit; Biogal Galed Laboratories, Israel). De forma importante, os métodos imunocromatográficos apresentam baixa sensibilidade quando comparados a outros métodos tradicionalmente utilizados para a triagem (Wanke et al., 2012), e são difíceis de adquirir.

Outros testes como a contraímunoeletroforese e imunofluorescência indireta raramente são empregados na rotina de diagnóstico, apesar de serem empregados em alguns estudos experimentais e levantamentos epidemiológicos (Wanke, 2004; Minharro et al., 2006).

Apesar da variedade de métodos de diagnóstico disponíveis, o diagnóstico da brucelose canina continua um desafio. Recentemente, Mol et al. (2020) demonstraram a grande discordância entre os principais métodos de diagnóstico que incluem o isolamento bacteriano, PCR, IDGA, fixação de complemento, microaglutinação e dot-ELISA. As amostras positivas na microaglutinação foram submetidas à confirmação após o tratamento com 2-ME, que sabidamente reduz a ocorrência de falso-positivos e aumenta a especificidade do teste (Keid et

al., 2009; Keid et al., 2015; Wanke et al., 2012). Após a aplicação destes métodos em 16 canis (200 filhotes), a concordância entre os métodos foi avaliada e indicou que a PCR e a microaglutinação (após o tratamento com 2-ME) apresentaram os resultados mais concordantes, apesar da concordância moderada. Estes resultados indicam que a melhor estratégia para o diagnóstico da infecção da *B. canis* em cães é a associação de métodos de diagnóstico. Ainda assim, existem possibilidade de falhas na detecção dos positivos (Mol et al., 2020).

1.5 Epidemiologia da brucelose canina

Na América do Norte a brucelose canina vem sendo diagnosticada e monitorada desde o primeiro relato de cães infectados por *B. canis* na década de 60 (Carmichael, 1966). Especificamente nos Estados Unidos, a frequência de cães positivos variou nesta época de 0,5% a 9,4% (Brown et al., 1976; Lovejoy et al., 1976). Embora sejam aplicadas medidas de controle e erradicação da doença, que incluem o isolamento de animais suspeitos e a eutanásia de animais positivos, a frequência de cães positivos em 2007 no estado de Wisconsin foi de 4,6% (Brower et al., 2007). No Canadá, apesar da proximidade com os Estados Unidos a doença tem se mantido controlada e a frequência média de cães positivos no país é de 0,5% (Higgins et al., 1979; Bosu e Prescott, 1980) com um único relato recente de um surto da doença em um canil (Brennan et al., 2008). Enquanto nos países do Norte a frequência tem se mostrado controlada e estável, os estudos no México indicam a dispersão e aumento dos cães infectados. Enquanto na década de 70 Flores-Castro e Segura (1976) demonstraram que 28% (140/500) dos cães da Cidade do México foram positivos para *B. canis*, em 2004, Gonzáles et al. (2004) detectaram 42% de animais positivos na sorologia. Na América central não existem estudos da dispersão da brucelose canina, assim como relatos de cães infectados por *B. canis*.

Na América do Sul, trabalhos demonstram, desde a década de 70 (Sandoval et al., 1976) a circulação do agente. Cães infectados por *B. canis* já foram diagnosticados no Brasil (Wald e Fernandes, 1976), Argentina (Myers e Varela-Díaz, 1980), Chile (Zamora et al., 1980) e Colômbia (Pardo et al., 2009). No Brasil, a média de cães infectados no país é de 10,3%, no entanto, existem relatos de regiões com até 54% de cães positivos (Santana et al., 2013), que serão detalhados no próximo tópico. Na Argentina, no primeiro estudo realizado foram detectados 30,5% de cães positivos para *B. canis* (Myers e Varela-Díaz, 1980) enquanto nos estudos mais recentes, 7,3 e 14,7% apresentaram soropositividade (Boeri et al., 2008; López et al., 2009). Apesar de os estudos recentes terem concentrado sua amostragem na região de Buenos Aires, a diferente frequência encontrada pode ter ocorrido pela utilização de técnicas sorológicas diferentes, SAR (Soroaglutinação Rápida) e IDGA, respectivamente. No Chile e Colômbia, a média de cães positivos não é discrepante (7,4 e 6,9%, respectivamente). Além disso, os levantamentos epidemiológicos da brucelose canina são recentes quando comparado ao países do continente norte-americano, exceto pelo estudo de Zamora et al. (1980), que obteve a maior frequência de cães positivos (21,84%) e foi o único a utilizar a ALT para o diagnóstico (Pardo et al., 2009; Abarca et al., 2011; AgueldoFlores et al., 2012; Castrillón-Salazar et al., 2013; Tuemmers et al., 2013; Peña et al., 2016).

No continente Africano, levantamentos da frequência de cães acometidos por *B. canis* já foram realizados na África do Sul, Guiné, Nigéria e Zimbábue, onde foram detectados 9,5%, 0,4%, 11,03% e 17,6% de soropositividade, respectivamente (Adesiyun et al., 1986; Patten, 1987; Cadmus et al., 2011; Chinyoka et al., 2014; Etsebeth, 2017). Adicionalmente, relatos pontuais de cães infectados diagnosticados por isolamento bacteriano já foi realizado na África do Sul (Gous et al., 2005).

Na Austrália, a infecção de cães por *B. canis* não foi constatada até 1981 (Ekers, 1978). Após este período, foi detectada a presença de anticorpos anti- *B. canis* em 5,5% de cães

submetidos à avaliação no período entre 1982-1985 (Medveczky e Crichton, 1986). Na Nova Zelândia, não foram encontrados cães positivos para *B. canis* (Gardner e Reichel, 2007). Nas últimas décadas, um grande problema instaurado com a infecção de suínos ferais por *B. suis* tem refletido no acometimento de cães com a doença. Decorrente da caça, alimentação de cães com carne de suínos ferais ou mesmo a permanência de ambas as espécies em ambientes comuns, levou ao aumento de 17 vezes no número de cães positivos para *B. suis* (16,5% de cães positivos; 72/437) (Mor et al., 2016).

No continente Asiático estão localizados os países com a maior frequência de cães diagnosticados com brucelose canina com destaque para a China (47,7%), Mongólia (36,5%) e Irã (17,2%) (Zolzaya et al., 2004; Jiang et al., 2012; Mosallanejad et al., 2009; Akhtardanesh et al., 2011; Bigdeli et al., 2011; Behzadi e Mogheiseh, 2011). Nos demais países do continente a frequência de detecção de cães positivos para *B. canis* varia de 1,3% na Coreia do Sul (Jung et al., 2018) à 12,7% na Turquia (Onçel et al., 2005).

O continente Europeu comumente considera a brucelose canina controlada, especialmente pelas medidas de controle rigorosas aplicadas (Holst et al., 2012). No entanto, na Espanha, Hungria e nos países que compõe o Reino Unido (UK) a brucelose canina foi detectada em 20,2%, 23% e 28,4% dos cães, respectivamente (Mateu-de Antonio et al., 1994; Taylor, 1980; Gyuranecz et al., 2011). Além disso, levantamentos sorológicos na Suécia, Alemanha e Itália indicam a presença de 12%, 7,4% e 1,1% de cães positivos, respectivamente (Von Kruedener, 1976; Weber e Schliesser, 1978; Ebani et al., 2003; Kaden et al., 2014). Na Suíça e na Áustria, apesar de não existirem levantamentos epidemiológicos, a ocorrência de cães positivos para *B. canis* já foi constatada (Hofer et al., 2012; Egloff et al., 2018). Enquanto na Finlândia não foram detectados cães positivos para *B. canis* (Dahlbom et al., 2009)

Para determinar a distribuição da brucelose canina no mundo, foi realizada uma pesquisa na literatura científicos nas bases de dados *Pubmed* e *Google Acadêmico*, com as palavras-chave: “nome do país” (Ex: Alemanha) + “*Brucella canis*” ou “canine brucellosis” ou “*Brucella dogs*”. Os artigos científicos resultantes da busca estão sumarizados na Tabela Suplementar 1 (exceto os artigos referentes ao Brasil, que estão descritos na Tabela 1). Visto que, no mesmo país, diferentes trabalhos podem resultar em diferentes frequências, foi considerada a média ponderada (considerando a população amostrada e a frequência de positivos) para cada território. O mapa mundial da distribuição da frequência de cães positivos para *B. canis* está demonstrado na Figura 1.

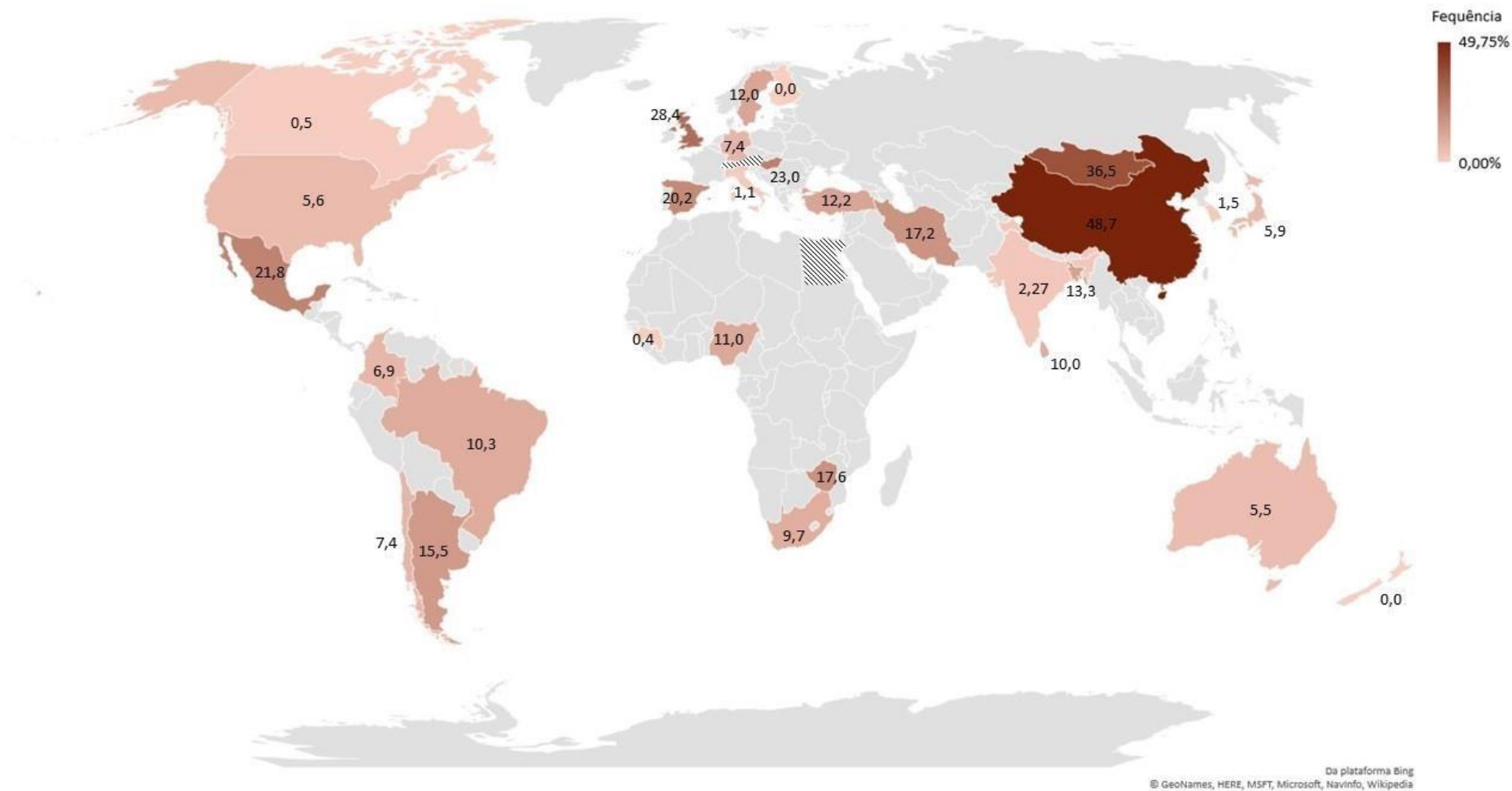


Figura 1. Distribuição mundial da frequência de cães infectados por *B. canis* por país. A frequência de cada país foi obtida por média ponderada da frequência relatada em cada estudo disponíveis no PubMed e Google Acadêmico e em seguida o mapa foi confeccionado utilizando o software Microsoft Excel. Os países apresentando padrões com linhas pretas indicam países com relatos de cães infectados por *B. canis* mas sem estudos de frequência da doença. A tabela contendo as referências e os trabalhos utilizados na confecção do mapa estão inseridos como Anexo (Tabela Suplementar 1).

No Brasil, numerosos levantamentos têm sido realizados nas últimas décadas, no entanto, as áreas estudadas concentram-se em regiões de maior desenvolvimento técnico-científico, possivelmente estimulados pela presença da comunidade científica das universidades. A frequência de animais positivos obtida em cada levantamento da ocorrência da brucelose no território brasileiro está sumarizada na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de cães positivos para brucelose canina causada por *Brucella canis* em cidades brasileiras.

Estado	Cidade	Método de diagnóstico	Frequência	Referência
Sudeste				
ES	Vila Velha	PCR	21% (42/200)	Souza et al. (2018)
MG	Alfenas	IDGA	14,2% (90/635)	Almeida et al. (2004)
MG	Belo Horizonte	IDGA	1,3% (1/76)	Godoy et al. (1977)
MG	Belo Horizonte	IDGA	4,8% (65/1368)	Souza et al. (2002)
MG	Uberlândia	IDGA	0,0% (0/140)	Castro et al. (2014)
RJ	Rio de Janeiro	IDGA	19,2% (28/146)	Vieira et al. (2000)
RJ	Rio de Janeiro	IDGA	9,2% (11/119)	Moraes et al. (2002b)
SP	Botucatu	SAR-2ME ³	0,84% (19/1072)	Moraes et al., (2002a)
SP	Ibiúna	Hemocultura	1,05% (6/570)	Mascolli et al. (2016)
SP	São João da Boa Vista	IDGA	0,8% (4/500)	Reis et al. (2008)
SP	São Paulo	ALT ¹	3,6% (8/221)	Sandoval et al. (1976)
SP	São Paulo	ALT	7,0% (14/200)	Larsson et al. (1981)
SP	São Paulo	IDGA ²	7,5% (254/3386)	Cortes et al. (1988)
SP	São Paulo	IDGA	33,9% (58/171)	Keid et al. (2004)
SP	São Paulo	Hemocultura	14,0% (24/171)	Keid et al. (2004)
SP	São Paulo	Hemocultura	20,9% (158/753)	Keid et al. (2017)
SP	Santana da Paraíba	IDGA	2,2% (9/410)	Azevedo et al. (2003)
Nordeste				
AL	Maceió	IDGA-2ME ⁴	3,3% (3/90)	Porto et al. (2008)
BA	Salvador	IDGA	5,8% (5/85)	Cavalcanti et al. (2006)
BA	Salvador	ELISA	33,8% (60/177)	Oliveira (2008)
BA	Camaçari	IDGA	37,0% (40/108)	Melo et al. (1998)
PB	Campina Grande	IDGA	2,3% (4/170)	Vasconcelos et al. (2008)
PB	Patos	IDGA	3,1% (6/193)	Fernandes et al. (2011)
PI	Teresina	IDGA	7,4% (44/591)	Lima et al. (2014)
RN	Natal	IDGA	28,8% (120/416)	Fernandes et al. (2013)
SE	Aracajú	IDGA	1,6% (1/60)	Lima (2009)
Norte				
PA	Belém	IDGA-2ME	0,0% (0/182)	Paz et al. (2015)
RO	Monte Negro	IDGA-2ME	0,0% (0/175)	Aguiar et al. (2005)
TO	Araguaína	IDGA	44,6% (167/374)	Dorneles et al. (2011)
TO	Araguaína	IDGA	54,7% (132/241)	Santana et al. (2013)
Centro- Oeste				
MT	Cuiabá	PCR	24,1% (79/327)	Silva et al. (2012a)
Sul				
PR	Região Norte ⁵	IDGA	4,0% (4/100)	Silva et al. (2012b)
PR	Londrina	IDGA	5,4% (1/22)	Machado (2013)
PR	Umuarama	IDGA	2,8% (5/175)	Dreer et al. (2013)
RS	Porto Alegre	ALT	11,9% (23/192)	Wald e Fernandes (1976)

¹ALT: Aglutinação Lenta em Tubos, ²IDGA: Imunodifusão em Gel de Agarose, ³SAR-2ME: Soroaglutinação Rápida com 2-Mercaptoetanol, ⁴IDGA-2ME: Imunodifusão em Gel de Agarose com 2-Mercaptoetanol, ⁵Região Norte: compreende as cidades de Apucarana, Arapongas, Rolândia e Londrina.

No primeiro levantamento sorológico de brucelose canina realizado no estado de São Paulo, 3,6% dos cães (8/221) apresentavam anticorpos anti-*B. canis* detectados pelo teste de soroaglutinação lenta em tubos com antígeno de *B. canis*, enquanto um cão (0,45%) apresentou anticorpo contra *Brucella* lisa pelo teste de aglutinação em placa (AAT - Antígeno Acidificado Tamponado) (Sandoval et al., 1976). Em 1981, 364 cães foram avaliados também no estado de São Paulo e foi comparada a frequência de positivos entre cães oriundos de canis e cães errantes. Utilizando antígeno de *B. canis* em teste de aglutinação lenta em tubo, os autores observaram que a frequência de anticorpos contra *Brucella* em cães provenientes de canis foi de 2,4%, enquanto em cães errantes foram detectados em 7,0% dos animais (Larsson et al., 1981). Já em 1988, foram avaliadas 3.386 amostras de soro de cães errantes coletados entre o período de 1981 e 1985 nas quais foram detectados anticorpos contra *B. canis* em 7,5% das amostras (Cortes et al., 1988).

Em levantamento realizado por Keid et al. (2004) em 12 canis comerciais no estado de São Paulo, foram identificados no mínimo um animal por canil apresentado sinal clínico compatível com brucelose canina, com sorologia (IDGA) e hemocultura positiva. Dos 171 cães avaliados, 22,8% possuíam sinal clínico compatível com brucelose, 33,9% foram positivos no IDGA e 14,6% foram positivos na hemocultura, com pouca ou nenhuma concordância entre os métodos de diagnóstico utilizados. Já em 2017, em levantamento com 753 cães pertencentes à 38 canis de São Paulo, Keid et al. (2017) diagnosticaram 20,9% dos cães positivos no isolamento de amostras de *swab* vaginal ou sêmen e 22% de cães com sinal clínico ou histórico compatível com brucelose canina, entre eles aborto/natimortalidade, aumento de linfonodos, falhas de concepção, nascimento de filhotes fracos, descarga vaginal, orquite e epididimite.

Na cidade de Santana da Paraíba, 9,5% dos cães foram positivos no IDGA, no entanto, para determinação da prevalência foram consideradas apenas as reações positivas no IDGA confirmadas simultaneamente no 2-ME e FC, resultando em uma prevalência de 2,2% (Azevedo et al., 2003). Na microrregião de Botucatu, que contempla as cidades de Anhembi, Areiópolis, Bofete, Botucatu, Conchas, Itatinga, Laranjal Paulista, Pardinho, Pereiras, Pratânia e São Manuel, foram identificados 0,84% de cães positivos pela soroaglutinação rápida confirmada com 2-mercaptoetanol, distribuídos na zona rural e urbana das cidades mencionadas (Moraes et al., 2002a). Em São João da Boa Vista, 0,8% (4/500) dos cães errantes apresentaram anticorpos anti-*Brucella* spp. que possuem LPS rugoso (anticorpo anti-*B. ovis*) (Reis et al., 2008).

Em Ibiúna, estado de São Paulo, Masculli et al. (2016) avaliaram a prevalência de *B. canis* entre o período de 2007 e 2008 por hemocultivo. De 570 cães avaliados, 6 foram positivos, resultando em prevalência de 1,05%. Nos cães com resultado negativo não foi realizada nova coleta para confirmação do diagnóstico.

Na cidade do Rio de Janeiro 19,2% dos cães apresentaram evidência sorológica de infecção por *B. canis* pelo IDGA. De 146 cães avaliados, 17 positivos (11,6%) pertenciam a áreas urbanas e 11 (7,5%) pertenciam a áreas rurais, indicando a dispersão do agente nestes dois ambientes (Moraes et al., 2000). Na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, pela mesma técnica, 9,2% foram positivos (Moraes et al., 2001). Além das evidências sorológicas, *B. canis* foi isolada em amostras de sangue de três cães pertencentes a um canil com histórico de problemas reprodutivos (Ferreira et al., 2003). Outro estudo avaliando 316 cães pelo IDGA detectou 2,5% de cães soropositivos também pertencentes a cidade do Rio de Janeiro (Ferreira et al., 2007).

No primeiro levantamento sorológico realizado em Minas gerais, foram detectados 1,3% (1/76) de cães positivos pelo IDGA utilizando antígeno específico de *B. canis*, e simultaneamente o isolamento do agente partir de amostra de corrimento vaginal de uma cadela

com histórico de aborto, confirmando a circulação da *B. canis* em canis da cidade (Godoy et al., 1977). Em 2002, foi realizado um novo levantamento na cidade de Belo Horizonte, em que foram avaliados 1.368 cães pelo IDGA com antígeno de *B. ovis*, em que a prevalência da brucelose canina foi de 4,8% no período entre 1999 e 2000 (Souza et al., 2002).

Na cidade de Alfenas, Estado de Minas Gerais, 635 cães foram submetidos à sorologia com IDGA e destes, 14,2% foram positivos (Almeida et al., 2004). Na região de Uberlândia, também em Minas Gerais, não foram encontrados cães soropositivos para *Brucella* spp. com LPS rugoso utilizando a mesma metodologia (Castro et al., 2014).

No Espírito Santo, em estudo avaliando canis comerciais, Souza et al. (2018) detectaram 21% de positividade para *B. canis* por PCR e isolamento bacteriano em tecidos (coração, rim, baço e pulmão) de filhotes oriundos de aborto, natimortos ou neonatos. Os tecidos destes mesmos filhotes foram submetidos à avaliação histológica e apresentaram lesões compatíveis com brucelose, como áreas de necrose e infiltrado inflamatório histiocitário e neutrofílico. Além disso, a presença de *B. canis* foi confirmada por imuno-histoquímica.

Na região metropolitana de Salvador, Estado da Bahia (BA), 5,8% dos cães testados foram positivos no IDGA (Cavalcanti et al., 2006). Em estudo de prevalência utilizando ELISA indireto com antígeno de *B. canis* que estava sendo desenvolvido, a prevalência de brucelose canina no período de junho de 2005 a julho de 2006 foi de 23,3% em cães domiciliados e 37,5% em cães oriundos de abrigo, totalizando 978 cães avaliados (Oliveira, 2008).

Já na região de Camaçari, distrito de Monte Gordo, Bahia, foram avaliadas 108 amostras de soro de cães, em que foram identificadas 40 amostras positivas, que representam 37% do total de amostras avaliadas (Melo et al., 1997).

Em Aracaju, Estado de Sergipe, dos 60 cães avaliados por IDGA utilizando antígeno de *B. ovis*, um animal foi positivo no teste (1,6%) (Lima, 2009), enquanto em Maceió, Estado de Alagoas, foram detectados 3,3% de cães positivos no IDGA, confirmados com 2-ME (Porto et al., 2008).

Em Campina Grande – Paraíba (PB), a prevalência de anticorpos anti-*Brucella* spp. que possuem LPS rugoso em cães foi de 2,3% utilizando IDGA (Vasconcelos et al., 2008). Na mesma região foi avaliada a frequência de animais silvestres com anticorpos anti-*B. canis*, sendo que, dos 60 animais capturados, nenhum apresentou anticorpos anti-*Brucella* pelo IDGA (Azevedo et al., 2010). Na cidade de Patos, na Paraíba, 3,1% de cães tiveram resultados positivos no IDGA e destes, apenas um isolado bacteriano compatível com *B. canis* foi obtido da medula óssea (Fernandes et al., 2011).

Em Natal – Rio Grande do Norte (RN), 416 cães atendidos em clínicas veterinárias da região foram avaliados por sorologia (Fernandes et al., 2013). Destes animais, 120 (28,8%) foram positivos no IDGA. Em Teresina, Piauí, foram avaliados 591 cães oriundos de atendimento em clínicas veterinárias do município e destes 7,4% foram positivos para *Brucella* spp. com LPS rugoso pelo IDGA (Lima et al., 2014).

Em Rondônia, 3,6% dos cães foram positivos no IDGA, no entanto, a infecção foi descartada após o teste confirmatório usando 2-ME (Aguiar et al., 2005). No estado do Pará, um cão foi positivo no IDGA de 204 amostras de soro avaliadas. No entanto, após o tratamento com 2-ME a amostra não foi reagente no teste (Paz et al., 2015).

Em Araguaína, Tocantins, a prevalência da brucelose canina pelo IDGA no ano de 2005 foi de 44,6% (Dorneles et al., 2011). Na mesma cidade, no período de março a outubro de 2008, soro de 241 animais foram avaliados pela mesma técnica e foram detectados 54,7% de cães positivos (Santana et al., 2013).

Em Cuiabá, Mato Grosso, amostras de sangue total de cães foram submetidos a PCR. Das 327 amostras coletadas, 79 (24,1%) foram positivas para *Brucella* spp., indicando a circulação do agente nestes animais (Silva et al., 2012a).

Na região norte do Paraná, 100 cães provenientes de abrigos foram avaliados por IDGA e a frequência foi de 4% de positivos para *Brucella* (Silva et al., 2012b). Em Londrina, foram detectados pela da mesma técnica 5,4% de cães soropositivos e em Umuarama, 2,85% de cães de rua apresentaram anticorpo contra *B. canis* pelo IDGA (Dreer et al., 2013; Machado, 2013).

Em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, Wald e Fernandes (1976) detectaram pelo método de soroprecipitação lenta em tubos 11,9% de cães positivos para *B. canis*, de um total de 192 cães avaliados. Não foram encontrados na literatura inquéritos sorológicos da infecção de cães por *B. canis* nos demais estados brasileiros.

A falta de concordância entre os métodos de diagnóstico da brucelose canina (Mol et al., 2020) é uma informação de extrema importância. Além disso, a baixa acurácia para a determinação dos cães positivos é uma grande limitação dos métodos de diagnóstico empregados. A Figura 2 evidencia a predominância do uso do IDGA no diagnóstico da brucelose canina no Brasil, o qual sabidamente apresenta baixa eficácia no diagnóstico acurado de cães infectados (Mol et al., 2020).

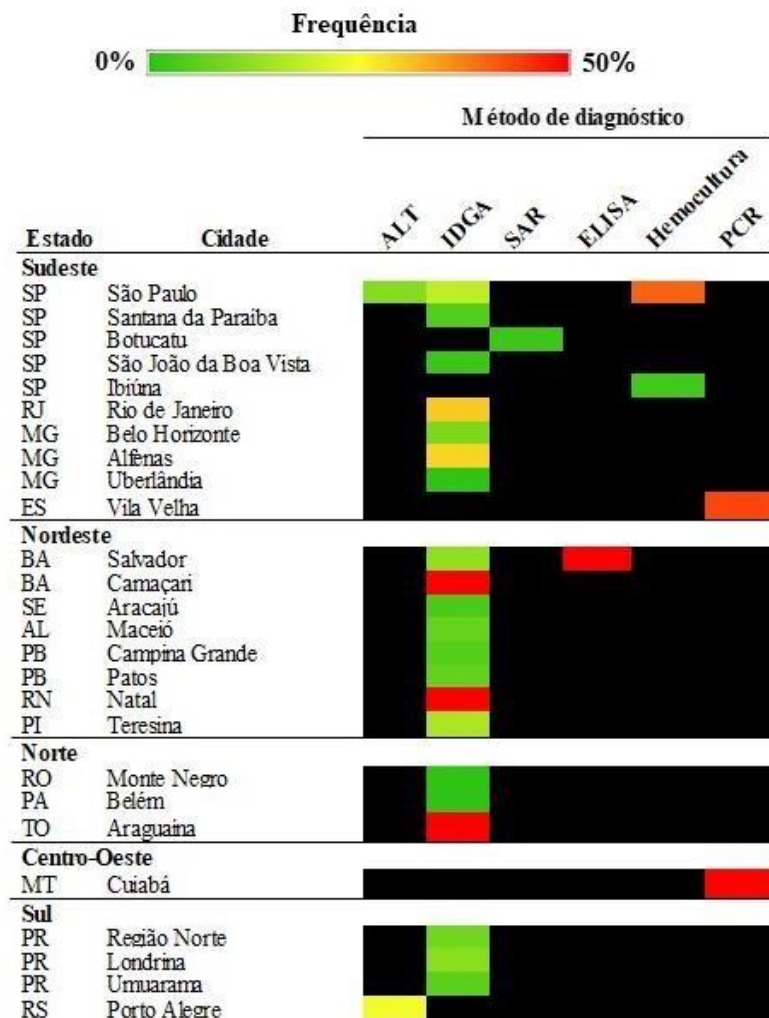


Figura 2. Heatmap da frequência da brucelose canina por método de diagnóstico encontrados na literatura referentes ao território brasileiro. Nas cidades em que existe mais de um levantamento epidemiológico foi considerada a média ponderada entre as frequências. As

células que aparecem em preto indicam a ausência de trabalhos na literatura utilizando estes métodos de diagnóstico na cidade avaliada. ALT: Aglutinação Lenta em Tubos, IDGA: Imunodifusão em Gel de Agarose, SAR: Soroaglutinação Rápida, ELISA: Ensaio Imunoenzimático, PCR: Reação em cadeia pela polimerase. Os trabalhos utilizados para confecção do *Heatmap* estão descritos na Tabela 1.

A grande variedade de métodos empregados dificulta a interpretação da real distribuição da doença. Como pode ser observado na Tabela 1, além de poucos estudos de frequência realizados no Brasil, especialmente considerando o vasto território brasileiro, apenas na cidade de São Paulo os cães foram avaliados por mais de uma técnica, e ainda assim com grande variação de frequência entre elas, indicando a baixa concordância entre os métodos. Para observar e comparar a frequência entre os estados brasileiros, o mapa de distribuição da frequência no território brasileiro considerou apenas os levantamentos sorológicos. O mapa de distribuição da brucelose canina e dos estudos envolvidos está representado na Figura 3.

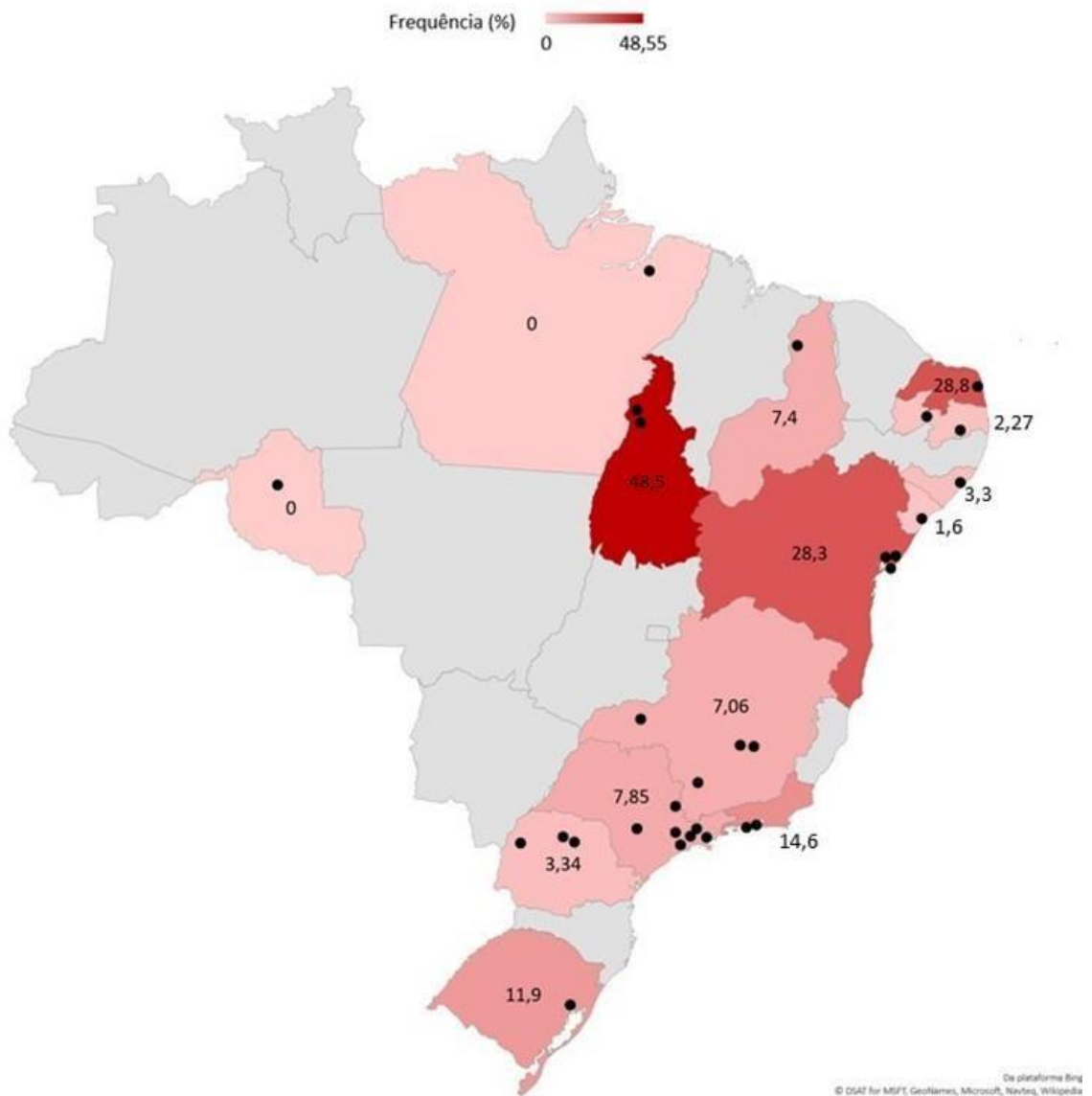


Figura 3. Distribuição da brucelose canina no território brasileiro. O mapa foi confeccionado em Excel 2016 considerando a média ponderada das frequências obtidas por testes sorológicos realizado em cada Estado. Cada ponto indica o local onde o estudo foi realizado.

1.6 Infecção de seres humanos por *Brucella canis*

Infecções humanas por *B. canis* foram relatadas pela primeira vez em 1968, afetando indivíduos que tiveram contato com cães infectados (Morisset e Spink, 1969; Swenson et al., 1972), e embora tenha sido descrita em vários países, sua prevalência é desconhecida (Monroe et al., 1975; Polt e Schaefer, 1982; Hollett, 2006; Lucero et al., 2008; Sayan et al., 2011; Angel et al., 2012; Krueger et al., 2014). Considerando que *B. canis* raramente é considerado no diagnóstico humano e o desafio no diagnóstico, o perfil real de humanos infectados por *B. canis* pode ser subestimado.

As infecções humanas por *B. canis* são adquiridas pela via oronasal por contato direto com um cão infectado, particularmente por contato com fetos, tecidos e secreções oriundos de abortos contaminados ou por contato indireto com amostras contaminadas, tendo um alto risco ocupacional. Para a maioria dos casos de infecções humanas por *B. canis*, há um contato prévio identificável com cães infectados ou materiais biológicos contaminados em laboratório (Morisset e Spink, 1969; Swenson et al., 1972, Monroe et al., 1975; Brown et al., 1976; Tosi e Nelson, 1982; Schoenemann et al., 1986; Wallach et al., 2004; Lucero et al., 2010a; Marzetti et al., 2013). Lucero et al. (2010a) descrevem um surto de brucelose humana que afeta três famílias que compram filhotes de uma cadela infectada, demonstrando grande potencial de transmissão de cães infectados para seus contatos.

Assim, a brucelose humana é considerada uma doença ocupacional, sendo que veterinários, trabalhadores em pet shops, funcionários e donos de canis, cuidadores e treinadores de cães e técnicos de laboratório são profissionais com maior risco de exposição ocupacional (Morisset e Spink, 1969; Monroe et al., 1975; Lucero et al., 2010a; Krueger et al., 2014; Nomura et al., 2010). Um estudo com 306 adultos assintomáticos com exposição ocupacional nos EUA demonstrou soroprevalência de 3,6% para *B. canis* (Krueger et al., 2014) e um interessante estudo epidemiológico realizado por Monroe et al., (1975) demonstrou maior prevalência de anti-*B. canis* em veterinários e pacientes com febre de origem desconhecida. As crianças, idosos e demais pessoas imunossuprimidas também podem ser consideradas como grupo de risco devido à proximidade com cães de estimação.

A infecção laboratorial por *B. canis* ocorre por contato com aerossóis formados durante práticas de rotina ou exposição acidental em laboratório (Morisset e Spink, 1969; Godoy et al., 1979; Wallach, et al., 2004; Marzetti et al., 2013). É importante ressaltar que a manipulação da maioria das espécies de *Brucella* spp., incluindo *B. canis*, deve ser realizada em condições de nível 3 de biossegurança (Traxler et al., 2013).

A brucelose humana causada por *B. canis* se assemelha às manifestações clínicas decorrente da infecção por outras espécies de *Brucella* spp., com sintomas inespecíficos, incluindo febre intermitente, calafrios, sudorese, perda de apetite, perda de peso, fadiga, dores de cabeça, dor nas costas ou dor nas articulações (Young, 1995; Pappas et al., 2005; Sayan et al., 2011). Embora *B. canis* seja considerada menos patogênica para o homem do que outras espécies de *Brucella*, manifestações graves como endocardite, aneurisma, peritonite, artrite, osteomielite e abscesso epidural foram descritas em pacientes infectados (Tosi e Nelson, 1982; Ying et al., 1999; McKee e Ballard, 1999; Piampiano et al., 2000; Marzetti et al., 2013; Manias et al., 2013). Síndromes neurológicas secundárias como Guillain-Barré (Marzetti et al., 2013) têm sido associadas à infecção por *B. canis*, bem como por outras espécies de *Brucella* spp. (Babamahmoodi e Babamahmoodi, 2011). A associação da infecção por *B. canis* juntamente

com outras doenças metabólicas ou imunológicas pode agravar a brucelose em pacientes humanos (Lawaczeck et al., 2011; Lucero et al., 2010b; Marzetti et al., 2013; Javeri et al., 2014). De fato, a imunodeficiência pode ser um fator de risco para infecção humana por *B. canis* (Lucero et al., 2010b; Lawaczeck et al., 2011).

O diagnóstico de brucelose humana por *B. canis* é desafiador, pois está associado a sintomas inespecíficos e bacteremia intermitente. O isolamento do agente é laborioso e demorado e nem sempre bem-sucedido. Além disso, não existem métodos sorológicos padronizados para detectar a infecção em seres humanos. Assim, a doença humana é subdiagnosticada e sua importância na saúde pública é amplamente negligenciada (Scheftel, 2003; Krueger et al., 2014).

O tratamento da brucelose em seres humanos é baseado no uso de antibióticos capazes de atuar em meio intracelular por tempo prolongado (Pappas et al., 2005). Alguns dos antibióticos descritos na literatura para o tratamento da brucelose em humanos são a doxiciclina (Ying et al., 1999; Piampiano et al., 2000; Lucero et al., 2005b; Nomura et al., 2010; Lawaczeck et al., 2011; Lucero et al., 2010b; Marzetti et al., 2013; Javeri et al., 2014), estreptomicina (Swenson et al., 1972; Rifkin et al., 1978; Godoy et al., 1979; Rousseau, 1985; Schoenemann et al., 1986; Nomura et al., 2010), rifampicina (Ying et al., 1999; Piampiano et al., 2000; Lucero et al., 2005b; Lawaczeck et al., 2011; Marzetti et al., 2013; Dentinger et al., 2015), gentamicina (Marzetti et al., 2013; Manias et al., 2013; Javeri et al., 2014), trimetoprim-sulfametoxazol (Schoenemann et al., 1986; Lucero et al., 2010a; Marzetti et al., 2013; Dentinger et al., 2015), ofloxacina (Ying et al., 1999), ciprofloxacina (Lucero et al., 2010b), tetraciclina (Morisset e Spink, 1969; Rifkin et al., 1978; Rousseau, 1985), ampicilina (Swenson et al., 1972; Munford et al., 1975; Marzetti et al., 2013; Manias et al., 2013), sulfadiazina (Godoy et al., 1979), ceftriaxona (Lucero et al., 2010a) e cefalotina (Marzetti et al., 2013; Manias et al., 2013).

Nos primeiros relatos de infecção humana por *B. canis*, Morisset e Spink (1969) e Munford et al. (1975) descreveram o uso de monoterapia com tetraciclina e ampicilina, respectivamente. No entanto, a associação de dois ou mais antibióticos é considerada o tratamento consistente e eficaz, devido às altas taxas de recidiva da monoterapia (Al-Tawfiq, 2008). O tratamento geralmente é prolongado e varia de acordo com antibióticos de uma a seis semanas (Pappas et al., 2005).

O tratamento de crianças com doxiciclina e tetraciclina não é recomendado devido à coloração irreversível dos dentes (Corbel, 2006; Al-Tawfiq, 2008) e inibição do crescimento ósseo (Corbel, 2006). O cotrimoxazol e a rifampicina não são indicados pelos fabricantes para uso em crianças, além do uso desses medicamentos em monoterapia geralmente resultar em falha no tratamento (Corbel, 2006). Nesse caso, o tratamento geralmente é baseado na associação de trimetoprim-sulfametoxazol com rifampicina por 4-6 semanas, sem prejuízo na eficácia do tratamento (Dentinger et al., 2015).

Em gestantes, as tetraciclinas são contra-indicadas devido à coloração permanente da dentição fetal e ao potencial de induzir necrose do fígado e pancreatite (Corbel, 2006). Apesar de ser indicado para o tratamento da brucelose em gestantes (Corbel, 2006), o uso de sulfametoxazol e trimetoprim individualmente ou em combinação (cotrimoxazol) precisa ser evitado, devido ao seu potencial neurotóxico para o feto devido à elevação da bilirrubina plasmática que atinge o sistema nervoso central causando *kernicterus* (Thyagarajan e Deshpande, 2014). Em alguns casos de complicação por *Brucella* spp. em que há comprometimento osteoarticular e endocardite, o tratamento precisa ser prolongado, considerando que recidivas nesses casos são comuns (Ying et al., 1999; Corbel, 2006; Ulu-Kilic et al., 2014).

1.7 Controle e prevenção

Infelizmente, não há vacina comercial disponível para prevenção da brucelose canina. Portanto, as medidas de controle incluem testes de triagem em cães e canis suspeitos de brucelose, tratamento ou eutanásia de cães infectados e eliminação das bactérias do ambiente (Hollett, 2006; Makloski, 2011).

Em algumas regiões dos Estados Unidos e alguns países da Europa são instigadas estratégias como a submissão dos cães à testes de triagem anualmente ou duas vezes por ano e, em caso de resultados positivos ou inconclusivos, os cães devem ser submetidos a quarentena e testes de confirmação. A amostragem de fêmeas deve ser realizada durante ou próximo ao estro, quando houver maior probabilidade de bacteremia (Hollett, 2006; Greene e Carmichael, 2012). Em caso de confirmação do diagnóstico, a eutanásia deve ser considerada (Hollett, 2006). O tratamento com antibióticos é caro, prolongado e muitas vezes ineficaz, principalmente em cães infectados cronicamente. Portanto, o tratamento deve ser considerado apenas em casos excepcionais (Greene e Carmichael, 2012).

São necessárias precauções ao introduzir novos cães no canil ou utilizar sêmen para a reprodução, pois podem ser fontes de *B. canis*. Cães recém-adquiridos devem permanecer pelo menos um mês isolados de outros cães e devem ser introduzidos no canil somente após dois resultados negativos com intervalo de um mês (Fredrickson e Barton, 1974; Serikawa e Muraguchi, 1979; Rhoades e Mesfin, 1980; Currier et al., 1982; Johnson e Walker, 1992; Hollett, 2006; Greene e Carmichael, 2012). Cães com sinais clínicos compatíveis com brucelose não devem ser adquiridos (Greene e Carmichael, 2012). No caso de tratamento, todos os cães de um canil positivo devem ser testados mensalmente por pelo menos três meses após se tornarem negativos. Esse protocolo é particularmente importante, mesmo em casos de inseminação artificial (Hollett, 2006; Makloski, 2011; Greene e Carmichael, 2012). É importante ressaltar que, como a brucelose canina é uma zoonose com alto risco ocupacional, os proprietários e/ou funcionários de canis devem ser treinados, informados e protegidos adequadamente, principalmente para impedir o contato com cães e secreções infectados, principalmente durante o parto ou aborto. Os colaboradores, como funcionários e cuidadores, devem estar cientes da infecção por *B. canis* no canil e serem submetidos a testes de diagnóstico ou tratamento, se necessário (Makloski, 2011; Greene e Carmichael, 2012).

A eliminação de *B. canis* do meio ambiente é outro procedimento de controle muito importante. *B. canis* não sobrevive por períodos prolongados sob condições ambientais. É rapidamente eliminado pela maioria dos desinfetantes, incluindo hipoclorito de sódio a 1%, etanol a 70%, soluções de etanol/iodo, glutaraldeído e formaldeído (Hollett, 2006; Makloski, 2011). No entanto, matéria orgânica e baixas temperaturas podem prejudicar a eficiência do desinfetante. As superfícies podem ser descontaminadas com hipoclorito de sódio a 2,5%, que deve ser mantido sobre a superfície por pelo menos 1 h. A descontaminação das superfícies corporais pode ser feita com soluções a 70% de etanol ou iodo. Equipamentos podem ser descontaminado por autoclavagem a 121°C por pelo menos 15 min ou por calor seco a 160-170°C por pelo menos 1 h. A fervura por 10 min também inativa *Brucella* (CFSPH, 2012).

No caso de cães infectados com *Brucella*, os proprietários devem ser informados sobre os riscos zoonóticos antes de escolher o tratamento ou a eutanásia. Caso o proprietário decida manter o animal, deve ser realizada orquiectomia ou histerectomia para eliminar o local primário da infecção e diminuir o risco de transmissão (Hollett, 2006; Greene e Carmichael, 2012). O tratamento em vez da eutanásia deve ser realizado excepcionalmente e sob rigorosa supervisão de um veterinário e, no caso de tratamento, crianças ou pessoas imunocomprometidas não devem entrar em contato com o cão infectado (Megid et al., 2002). Os donos de cães também devem estar cientes de que o tratamento deve ser realizado

estritamente de acordo com as recomendações do veterinário e que, mesmo sob condições rigorosas, o tratamento pode não resultar em cura, quando uma segunda etapa de tratamento pode ser necessária (Hollett, 2006; Greene e Carmichael, 2012). Os cães tratados devem ser submetidos a testes repetidos. Resultados negativos por sorologia, PCR e isolamento bacteriano podem ser interpretados como presuntivos de cura (Greene e Carmichael, 2012). Além disso, semelhante ao detalhado para os canis, medidas para controlar a contaminação ambiental também devem ser aplicadas às famílias (Hollett, 2006; Makloski, 2011).

2. CAPÍTULO 2

***Brucella ovis* mutante no transportador ABC protege contra a infecção por *Brucella canis* no modelo murino**

2.1 INTRODUÇÃO

A brucelose canina é uma doença zoonótica com distribuição mundial causada por *B. canis* (Carmichael, 1966). Em cães, a infecção está associada a doença reprodutiva caracterizada por surtos de aborto, falha na concepção ou epididimite e orquite em machos (Wanke, 2004; Hollet, 2006; Gyurancz et al., 2011). Embora a brucelose humana causada por *B. canis* seja considerada pouco frequente e menos patogênica quando comparada à infecção causada por outras espécies de *Brucella* (Byndloss e Tsolis, 2016), o contato próximo entre cães e seres humanos torna o risco zoonótico por *B. canis* altamente significativo sob a perspectiva de saúde pública (Hensel et al., 2018).

As infecções de cães por *B. canis* tem sido diagnosticadas em todo o mundo (Hensel et al., 2018) e nas Américas, Ásia e África, a brucelose canina tem sido considerada endêmica em cães (Flores-Castro et al., 1977; Katami et al., 1991; Reynes et al., 2012; Chinyoka et al., 2014; Keid et al., 2017; Hubbard et al., 2018). Apesar de em certos países como o Reino Unido (Morgan et al., 2017) e Suécia (Kaden et al., 2014), as infecções de cães por *B. canis* serem menos frequentes, existem relatos de infecções, mesmo a eutanásia de cães infectados sendo adotada como medida de controle (Hubbard et al., 2018).

Os cães e o homem possuem contato próximo, e desta forma, as doenças zoonóticas, como a brucelose, possuem grande importância para a saúde pública (Hensel et al., 2018). Apesar de a eutanásia de cães infectados ser considerada uma alternativa para reduzir a prevalência da doença (Hollet, 2006), o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura é considerada uma das principais estratégias para evitar a transmissão.

Os transportadores ABC são considerados fatores de virulência de *Brucella* spp. (Rosinha et al., 2002; Silva et al., 2011). *B. ovis* possui um transportador ABC localizado na Ilha de patogenicidade 1 de *B. ovis* (BOPI-1), o qual é requerido para patogênese (Tsolis et al., 2009; Silva et al., 2011). A ausência deste transportador resulta na atenuação *in vitro* e *in vivo* em camundongos e ovinos (Silva et al., 2011; Silva et al., 2013; Silva et al., 2014; Macedo et al., 2015). A cepa mutante com esse transportador afuncional (*B. ovis* $\Delta abcBA$) é imunogênica em carneiros (Silva et al., 2013) e resulta em imunidade estéril contra a infecção experimental por *B. ovis* em carneiros (Silva et al., 2015b).

Considerando que *B. ovis* não é patogênica para seres humanos e cães, assim como as similaridades estruturais entre *B. ovis* e *B. canis*, os quais possuem LPS naturalmente rugoso (Xavier et al., 2009), este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de proteção da cepa candidata vacinal *B. ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) contra a infecção por *B. canis* em camundongos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Declarações de ética

Os experimentos em que foram realizados procedimentos em cães, ovinos e camundongos, seguiram estritamente todas as leis e regulamentos aplicáveis e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo CEUA-UFGM 244/2014.

2.2.2 Cepas bacterianas e condições de cultura

B. canis ATCC 23365, *B. ovis* ATCC 25840, e *Bo* $\Delta abcBA$ (previamente descrita por Silva et al., 2011) foram utilizadas neste estudo. *B. ovis* ATCC 25840 e *Bo* $\Delta abcBA$ foram

cultivadas em ágar triptona de soja (TSA) com 1% de hemoglobina (Becton Dickinson, Brasil), por 3 dias a 37°C em atmosfera umidificada e com 5% CO₂. As colônias bacterianas foram ressuspendidas em PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4, Sigma-Aldrich, EUA), e a concentração do inóculo foi estimada por espectrofotometria (SmartSpec Plus Bio-Rad) fazendo a leitura em 600 nm (OD₆₀₀). Para identificar e diferenciar *BoΔabcBA*, 100 µg/mL de canamicina (Gibco, Brasil) foi adicionada ao TSA com 1% de hemoglobina. A infectividade e a capacidade de multiplicação intracelular de *B. canis* é negativamente afetada pelo tempo de cultivo (Chacón-Díaz et al., 2015), então *B. canis* foi cultivada em caldo triptona de soja (TSB) overnight (16-18 h) sob agitação (150 rpm) a 37°C. Após este período, o caldo foi centrifugado a 2.000 x g por 10 min a 21°C, o sedimento de bactérias foi ressuspendido em PBS e a concentração do inóculo foi determinada de forma similar ao descrito previamente. O cultivo de *B. canis* foi realizado sob condições de biossegurança de nível 3.

Para a inativação bacteriana, 10⁹ UFC/mL de *B. ovis* (ATCC 25840) e *B. canis* (ATCC 23365) em PBS foram submetidos à 15 Kgray de radiação gamma. Para confirmar a inativação, 100 µL do inóculo foi semeado em TSA com 1% de hemoglobina e incubado a 37°C e 5% de CO₂ por no mínimo sete dias.

2.2.3 Encapsulamento de *Brucella ovis* Δ*abcBA*

O encapsulamento de *BoΔabcBA* foi realizado como previamente descrito por Silva et al. (2015b). Suspensão bacteriana de *BoΔabcBA* contendo 1x10¹⁰ UFC/mL em PBS foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min a 21°C, e então ressuspendido em solução de alginato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) 1,5% (Alginato de Sódio 1,5%; 10 mM Ácido morfolinepropanesulfônico - MOPS; NaCl 0,85%). Esta mistura foi colocada em seringa de 1 mL e gotejada com agulha de 33G (0,23 x 4 mm) (TKS Lab, Japão) em solução de polimerização (100 mM CaCl₂; 10 mM MOPS; 0,85% NaCl) sob homogeneização constante a 18-21°C. Após 15 min, as cápsulas foram lavadas duas vezes com solução de MOPS (MOPS 10 mM; NaCl 0,85%), e então incubadas com Poli-L-Lisina 0,05% (Sigma-Aldrich, EUA) diluída em solução de polimerização e mantido a 18-21°C por 15 min sob homogeneização lenta. As cápsulas foram então homogeneizadas em solução de MOPS e suspendidas em alginato de sódio 0,03%. O alginato foi removido e as cápsulas foram inoculadas nos camundongos. Para o ensaio de proliferação de linfócitos e imunização dos cães, o mesmo protocolo de encapsulamento foi adotado, mas *BoΔabcBA* foi ressuspendida em alginato de sódio 1% (Sigma-Aldrich, EUA).

2.2.4 Isolamento, cultura e infecção de macrófagos derivados de monócitos ovinos e caninos

Os cães e ovinos utilizados neste estudo foram considerados livres de *Brucella* spp. com base em resultados de IDGA e PCR de sangue (Baily et al., 1992).

Os macrófagos derivados de monócitos foram obtidos como previamente descrito por Macedo et al. (2015). Resumidamente, 52 mL de sangue de cães (n = 3) e ovinos adultos (n = 3) foram coletados em seringas estéreis contendo 8 mL ácido citrato-dextrose (ACD) por punção da veia jugular. Imediatamente o sangue foi levado ao laboratório e diluído em igual volume de PBS (pH 7,4; Sigma-Aldrich, EUA) e gentilmente depositado em coluna de solução Histopaque (densidade 1,077 g/mL; Sigma-Aldrich, EUA), seguido por centrifugação à 1000 x g por 40 min a 18°C com aceleração e frenagem lenta. A camada mononuclear foi coletada e transferida para tubos cônicos estéreis de 50 mL. As células foram incubadas por 5 min com tampão de lise (tris-cloreto de amônio), e então lavados três vezes com PBS e ressuspendidos em RPMI (Invitrogen, EUA) suplementado com de 4 mM L-glutamina (Invitrogen, EUA), 1 mM de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen, EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Invitrogen,

EUA), 2,9 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, EUA), e 100 UI/mL de penicilina/streptomicina. A suspensão de células foi transferida para frascos Erlenmeyers de teflon de 50 mL (Nalgene, EUA), e incubados a 37°C em 5% CO₂ por 24 h. Após este período as células não aderentes foram removidas e foi adicionada às células meio RPMI suplementado sem a adição de antibióticos. Os frascos de cultura foram incubados a 37°C em 5% de CO₂, trocando o meio a cada 3 dias. Após 11 dias de incubação, os macrófagos caninos e ovinos foram removidos dos frascos de Teflon por resfriamento do Erlenmeyer em gelo por 40 min, seguido de agitação vigorosa. O RPMI com células foi transferido para tubos cônicos estéreis de 50 mL, livres de pirógeno, seguido por centrifugação a 1000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI suplementado. O número de células viáveis foi determinado por exclusão em azul de tripan em uma câmara de hemocítômetro. Uma suspensão de células de 100 µL contendo 5x10⁵/mL de macrófagos foi inserida em cada poço em placas de 96 poços e incubada à *overnight* a 37°C em 5% de CO₂.

Macrófagos ovinos e caninos foram inoculados com *B. ovis*, *B. canis* ou *BoΔabcBA* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100. As placas foram centrifugadas a 400 x g por 5 min a 21°C e depois incubadas por 30 min a 37°C em 5% de CO₂. Os inóculos foram removidos e as células lavadas com PBS estéril, seguido de incubação com gentamicina (50 µg/mL) diluída em RPMI por 1 h. As células foram então lavadas uma vez e incubadas com água estéril por 20 min para lise. As células foram removidas mecanicamente e cada poço foi lavado com PBS estéril, submetido à diluição seriada e semeado em TSA com 1% de hemoglobina com ou sem canamicina, e incubadas por 3 a 5 dias a 37°C e 5% de CO₂ para contagem de UFC. Procedimentos semelhantes foram repetidos 4, 24 e 48 h após a infecção (hpi) para estimar a multiplicação intracelular de bactérias. Após a remoção do RPMI com 50 µg/mL de gentamicina, as células foram mantidas em meio RPMI contendo 25 µg/mL de gentamicina, até a lise. Três experimentos independentes foram realizados em triplicatas.

2.2.5 Ensaio de proliferação de linfócitos

Três grupos de camundongos BALB/C com 6 a 7 semanas de idade foram imunizados por via subcutânea com 100 µL de *BoΔabcBA* encapsulada com alginato (10⁸ UFC por camundongos) (n = 7), cápsulas de alginato estéril (n = 7) ou PBS (n = 6). Quatro semanas após a imunização os camundongos foram eutanasiados com cloridrato de xilasina a 2% (0,6 mg/kg) e cloridrato de cetamina a 1% (27 mg/kg) por via intraperitoneal, seguido de deslocamento cervical.

O ensaio de proliferação de linfócitos foi adaptado de Abkar et al. (2017). O baço dos camundongos foi coletado assepticamente e macerado em placas Petri estéreis com o êmbolo de seringas de 10 mL. As células foram transferidas para tubos cônicos, homogeneizados com pipeta estéril de 1 mL e centrifugadas a 300 x g por 10 min a 4°C. As células foram ressuspensas com tampão de lise de células vermelhas (tris-cloreto de amônia), incubados por 5 min e centrifugados a 300 x g por 10 min a 4°C. As células foram então lavadas com PBS estéril seguido de centrifugação (300 x g por 10 min a 4°C) e ressuspensas em RPMI com 10% SFB.

A viabilidade e a concentração das células foram avaliadas por exclusão em azul de tripan em câmara de hemocítômetro. As células foram semeadas em duplicata ou triplicata para cada tratamento em placa de 96 poços contendo 5 x 10⁵ células viáveis por poço em 100 µL. As células foram estimuladas com 100 µL de RPMI (controle negativo) ou *B. canis* ou *B. ovis* gama-irradiadas (equivalente a 10⁸ UFC/poço). As placas foram incubadas a 37°C com 5% de

CO₂ por 72 h. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 400 x g por 10 min e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C até a mensuração de citocinas.

Para avaliação da proliferação linfocitária, 20 µL de MTT (brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Invitrogen, EUA) a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por 2 h a 37°C com 5% de CO₂, protegido da luz, seguido de adição de 100 µL de SDS a 10% (dodecilsulfato de sódio) com HCl. Após incubação à *overnight* a 37°C e 5% de CO₂, as placas foram lidas em leitor ELISA (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 596 nm.

2.2.6 Resposta de citocinas

As concentrações de IFN-γ e IL-10 no sobrenadante de esplenócitos estimulados foram medidas por ELISA Sanduíche (DuoSet ELISA, R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura (4 µg/mL), incubada a 18-21°C à *overnight* (16-18h). As placas foram então lavadas com tampão de lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS) e bloqueadas com 0,1% e 1% de BSA em PBS, para IFN-γ e IL-10, respectivamente por 1 h. Os poços foram lavados e 100 µL da amostra ou padrão diluído (contido no kit para a curva padrão) foi adicionado e incubados por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e o anticorpo de detecção foi adicionado, incubado por 2 h em temperatura ambiente, lavadas e incubadas com estreptavidina por 20 min, protegido da luz. As placas foram então incubadas por 20 min a 18-21°C com θ-fenilenodiamina (OPD; Sigma-Aldrich, EUA; 0,5 mg/mL) diluídas em tampão ácido (ácido cítrico 0,1 M; fosfato de sódio 0,2

M - pH 5,0) por 10 min, seguido de adição de 50 µL da solução de parada (2 N H₂SO₄). As placas foram lidas em um leitor ELISA (MR-96A Microplate Reader) a 450 nm.

2.2.7 Ensaio de proteção em camundongos

Dois grupos de camundongos, fêmeas BALB/C de 10 a 12 semanas de idade foram imunizados subcutaneamente com 100 µL de cápsulas de alginato contendo 10⁸ UFC de *BoΔabcBA* (n = 5) ou inoculadas com o mesmo volume de PBS (n = 5). Durante o experimento no NBS3 os camundongos foram mantidos em racks ventiladas, com gaiolas vedadas e ventilação com filtro HEPA. Quatro semanas após a imunização, os camundongos foram desafiados intraperitonealmente com 10⁶ UFC/camundongo de *B. canis*. Duas semanas depois, os camundongos foram submetidos à eutanásia com cloridrato de xilazina a 2% (0,6 mg/kg) e cloridrato de cetamina a 1% (27 mg/kg) por via intraperitoneal, seguido por deslocamento cervical.

Fragments de baço dos camundongos foram pesados e homogeneizados em 2 mL de PBS estéril com macerador automático (Hamilton Beach, EUA). O homogeneizado do baço foi submetido à diluição seriada (1:10) em PBS estéril e plaqueado em duplicata em TSA com 1% de hemoglobina. A contagem de UFC foi realizada após 3 dias de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Para diferenciar a cepa vacinal (*BoΔabcBA*) e *B. canis*, as diluições de tecidos macerados foram semeadas em TSA com 1% de hemoglobina e 100 µg/mL de canamicina. Após a contagem das colônias, o número de UFC foi ajustado por grama de tecido. Os índices de proteção foram determinados considerando a diferença no log de UFC nos baços de camundongos controle não vacinados e camundongos vacinados.

Fragments de baço e fígado foram submetidos à histopatologia e imunohistoquímica.

2.2.8 Imuno-histoquímica (IHQ)

A IHQ foi realizada em amostras de baço e fígado de acordo com Paixão et al. (2009). Resumidamente, secções de 4 µm de tecido parafinado foram desparafinadas e hidratadas através de concentrações decrescentes de etanol, depois incubadas com reagente bloqueador de peroxidase (Kit EnVision™ FLEX, Dako, EUA) a 22°C por 30 min. As seções dos tecidos foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS; NaCl 1,5 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, NaH₂PO₄ 0,01 M), depois incubadas com leite desnatado diluído em PBS (1 g/40 mL) por 40 min a 22°C, seguido por incubação com anticorpo monoclonal primário anti-*B. melitensis* (1:100) por 1 h, seguido de incubação com o anticorpo secundário (HRP-Kit EnVision™ FLEX, Dako, EUA) por 20 min a 22°C. A reação foi revelada com o cromogênio 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) e contrastada com hematoxilina de Meyer. O anticorpo primário foi substituído por PBS como controle negativo.

2.2.9 Histopatologia

Amostras de baço e fígado foram fixados por 24 h imediatamente após a eutanásia por imersão em formalina 10% tamponada. Em seguida foram desidratados em concentrações crescentes de álcool: álcool 70% por 1 h, álcool 80% por 40 min, álcool 90% por 40 min e duas passagens em álcool absoluto de 1 h cada. Em seguida os fragmentos foram mantidos em xilol por 10 min e embebidos em parafina por 5 min. Os fragmentos foram emblocados com parafina e posteriormente foram obtidas secções de 3 a 5 µm em micrótomo histológico. Secções de 4 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados em microscopia óptica.

Os escores de lesão no baço e fígado foram determinados de acordo com Silva et al. (2011). O escore foi classificado como ausente (0), discreto (1), moderado (2) ou intenso (3) para a presença de microgranulomas no baço. No fígado foram atribuídos escores 0, 1, 2 ou 3 para a presença de microgranulomas, trombose e necrose, e o escore final do órgão é resultante da soma dos escores atribuídas às lesões.

2.2.10 Análise Estatística

Os dados de UFC foram submetidos à transformação logarítmica e em seguida a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey seguido de comparações múltiplas para o ensaio de produção de citocinas. Os escores histopatológicos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de KruskalWallis. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prism software versão 5.0, EUA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ é atenuada em macrófagos primários caninos

Não há relatos da infecção de cães por *B. ovis* ou estudos que indiquem a capacidade dessa espécie de *Brucella* spp. de infectar cães ou células caninas *in vitro*. Para avaliar o potencial de internalização e sobrevivência do *Bo* $\Delta abcBA$, macrófagos primários caninos e ovinos foram infectados com *B. canis*, *B. ovis* ou *Bo* $\Delta abcBA$ (Figura 4).

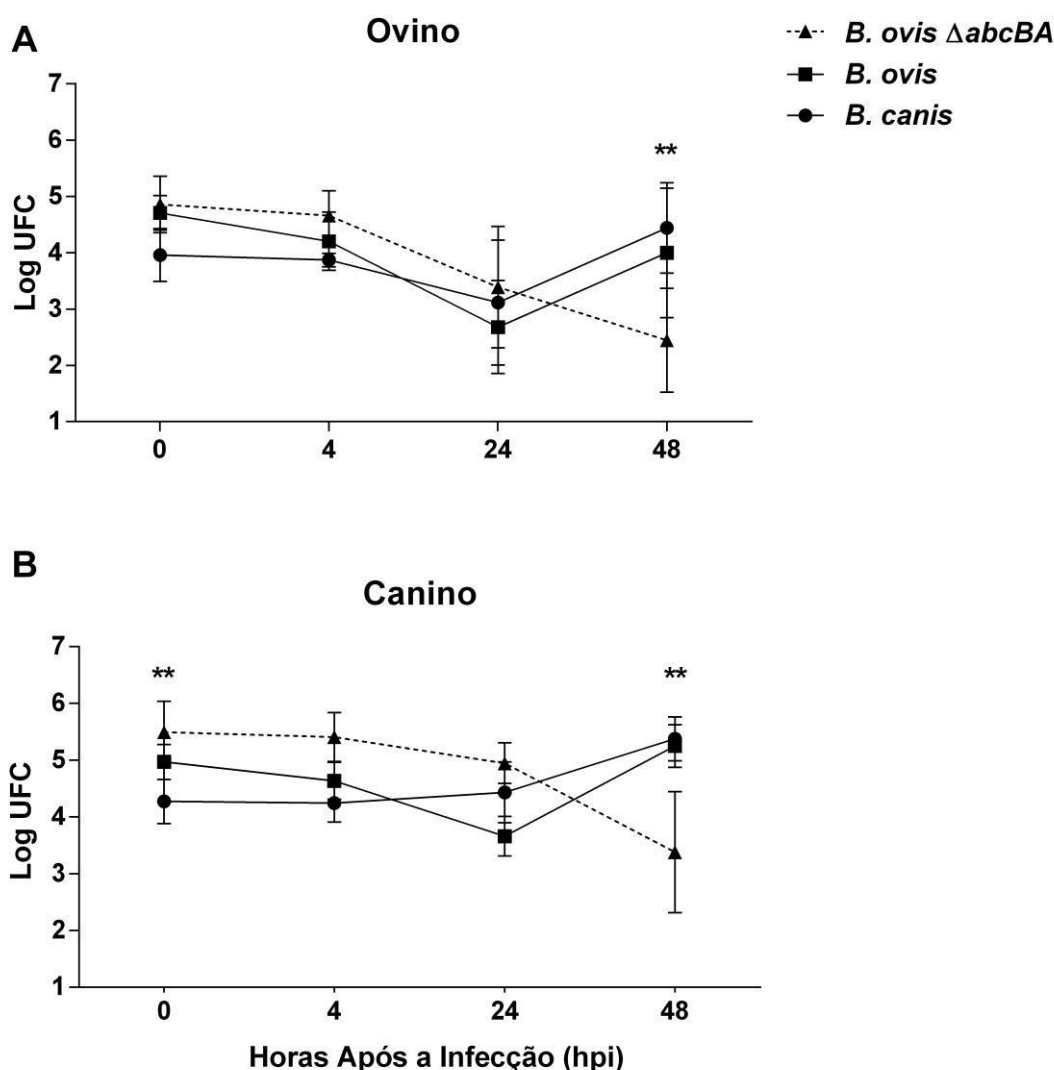


Figura 4. Internalização e multiplicação de *B. ovis* $\Delta abcBA$, *B. ovis* WT e *B. canis* WT em macrófagos primários ovinos (A) e caninos (B). Os macrófagos foram inoculados com *B. ovis*, *B. canis* ou *Bo* $\Delta abcBA$ no MOI de 100 e lisados a 0, 4, 24 e 48 hpi para estimar a internalização intracelular e a multiplicação de bactérias. Os dados representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O asterisco indica diferenças estatisticamente significativas entre a cepa mutante *Bo* $\Delta abcBA$ e o tipo selvagem *B. canis* ou *B. ovis* em cada momento do estudo (** = $p < 0,01$).

B. ovis e *B. canis* apresentaram cinética semelhante em macrófagos caninos e ovinos. Ambas as cepas foram estáveis ou tiveram um declínio 24 hpi, com evidente multiplicação intracelular às 48 hpi. Em contraste, a cepa mutante *Bo* $\Delta abcBA$ não foi capaz de se multiplicar no interior dos macrófagos caninos e ovinos e apresentaram números de UFC intracelulares significativamente reduzidos ($p < 0,01$) 48 hpi, indicando um fenótipo fortemente atenuado em macrófagos ovinos e caninos.

Curiosamente, a internalização de *Bo* $\Delta abcBA$ (0 hpi) em macrófagos caninos foi significativamente maior quando comparada à linhagem *B. canis* WT ($p < 0,01$). No entanto, essa maior taxa de internalização não influenciou o perfil de atenuação e redução da população

de *BoΔabcBA* dentro de macrófagos caninos a 48 hpi. Portanto, a cepa mutante *BoΔabcBA* foi capaz de infectar macrófagos primários de ovinos e caninos, e essa cepa exibiu um fenótipo atenuado nos macrófagos dessas duas espécies.

2.3.2 Resposta imunológica induzida por *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato em camundongos

A internalização de *BoΔabcBA* por macrófagos caninos com uma cinética semelhante à dos macrófagos ovinos indica que este candidato vacinal pode resultar na apresentação antigênica. Portanto, avaliamos as respostas imunológicas celulares promovidas por *BoΔabcBA* após a estimulação com *B. canis* inativada. Esplenócitos de camundongos BALB/C imunizados com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato (n = 7) ou controles não imunizados (cápsulas de alginato estéril n = 7 ou PBS n = 6) foram usados em um ensaio de proliferação celular *in vitro*, 4 semanas após a imunização (Figura 5).

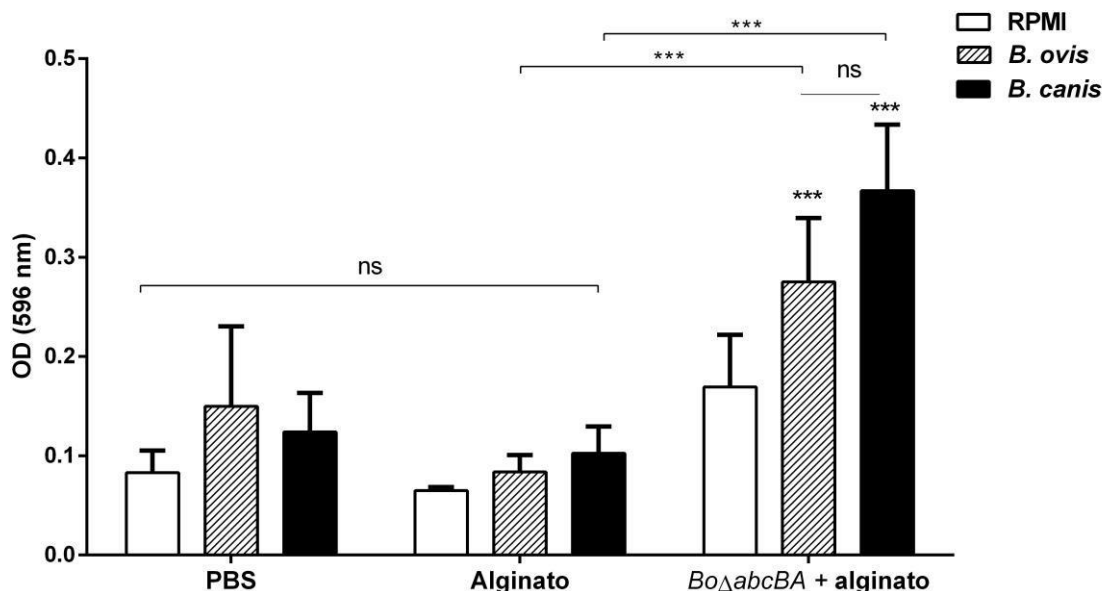


Figura 5. Ensaio de proliferação de linfócitos de camundongos BALB/C imunizados com *BoΔabcBA* encapsulado com alginato ou cápsulas de alginato estéril. Os camundongos inoculados com PBS foram utilizados como controlo negativo. Após quatro semanas de imunização, os esplenócitos de camundongos (5×10^5) foram estimulados com RPMI, *B. ovis* ou *B. canis* gama irradiados (correspondendo a 10^8 UFC/poço) por 72 h e a resposta proliferativa foi analisada pelo ensaio MTT. Os dados foram submetidos à ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (***) = $p < 0,001$; ns = $p > 0,05$).

Observou-se uma proliferação de esplenócitos significativamente maior ($p < 0,001$) em camundongos imunizados com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato quando comparado a camundongos inoculados com cápsulas estéreis de alginato ou PBS. É importante ressaltar que a estimulação de esplenócitos de camundongos imunizados com *BoΔabcBA* encapsulado em alginato com *B. ovis* ou *B. canis* gama irradiada resultou em proliferação linfocitária significativamente maior quando comparada aos esplenócitos tratados com RPMI ($p < 0,001$), e não houve diferença significativa entre esplenócitos estimulados com *B. ovis* ou *B. canis* ($p > 0,05$), apoiando ainda mais o potencial do *BoΔabcBA* em induzir uma resposta imunológicas potencialmente protetora contra *B. canis*.

Para melhor caracterizar a resposta imunológica, as concentrações de IFN- γ e IL-10 foram mensuradas em sobrenadantes de esplenócitos de camundongos imunizados e controle, como no experimento anterior (Figura 5), e estimuladas com *B. ovis* ou *B. canis* inativado. A inoculação de camundongos com PBS ou cápsulas estéreis de alginato respondeu à estimulação com *B. ovis* ou *B. canis* inativado com níveis mais baixos de IFN- γ e IL-10, enquanto esplenócitos de camundongos imunizados com *Bo Δ abcBA* e estimulados com *B. ovis* ou *B. canis* inativado respondeu produzindo níveis mais altos de IFN- γ e IL-10 (Figura 6).

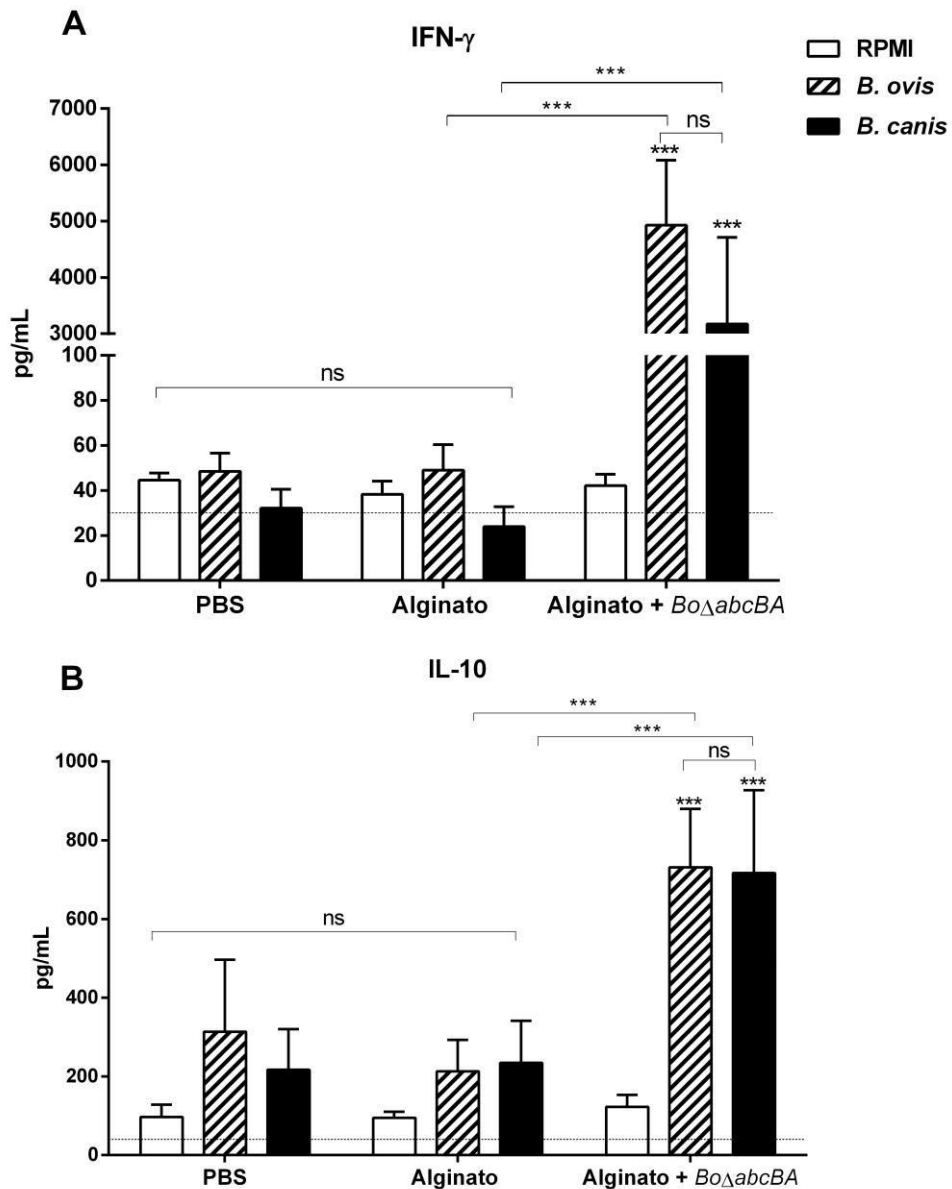


Figura 6. Produção de IFN- γ (A) e IL-10 (B) por esplenócitos de camundongos imunizados com *Brucella ovis* Δ abcBA (*Bo Δ abcBA*) ou camundongos inoculados com alginato estéril ou PBS. Quatro semanas após a imunização, os esplenócitos foram recuperados e estimulados com RPMI (controle negativo), *B. ovis* inativado ou *Brucella canis*. Às 72 h após a estimulação, os sobrenadantes foram recuperados e os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA sanduíche específico. A linha pontilhada indica o limite de detecção do teste. Cada ponto de dados representa média e DP de 6 ou 7 camundongos em duplicata para cada estímulo (***) p

< 0,001). Os dados foram submetidos à ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (***) = $p < 0,001$; ns = $p > 0,05$).

A produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos imunizados com *Bo* Δ *abcBA* encapsulado e estimulados com *B. ovis* inativado foi aproximadamente 100 vezes maior ($p < 0,001$) quando comparado aos esplenócitos estimulados com RPMI. É importante ressaltar que resultados semelhantes foram observados no grupo imunizado com *Bo* Δ *abcBA* encapsulado e estimulado com *B. canis*, sem diferença significativa entre os esplenócitos de camundongos estimulados com *B. ovis* ou *B. canis* ($p > 0,05$). Como esperado, os esplenócitos de camundongos inoculados com cápsulas estéreis de alginato ou PBS não responderam à estimulação com *B. ovis* ou *B. canis* inativado com produção de IFN- γ (Figura 6).

A IL-10 foi produzida por esplenócitos de camundongos imunizados com *Bo* Δ *abcBA* encapsulado em alginato e estimulada com *B. ovis* ou *B. canis*, embora com uma magnitude de resposta muito mais baixa (aproximadamente 2 vezes) quando comparada ao IFN- γ . Esplenócitos de camundongos inoculados com cápsulas estéreis de alginato ou PBS não responderam à estimulação com *B. ovis* inativado ou *B. canis* com produção de IL-10 (Figura 6).

2.3.3 *Brucella ovis* Δ *abcBA* encapsulada com alginato protege contra a infecção por *Brucella canis*

Em estudos anteriores, a forte atenuação e a baixa persistência de *Bo* Δ *abcBA* em camundongos (Silva et al., 2011) foram compensadas pelo encapsulamento com alginato, resultando em maior proteção contra o desafio com *B. ovis* WT (Silva et al., 2015a). Neste estudo, os camundongos foram imunizados com *Bo* Δ *abcBA* encapsulada em alginato, seguido de desafio com *B. canis* 4 semanas após a imunização. Os camundongos foram submetidos à eutanásia duas semanas após o desafio e as cargas bacterianas no baço foram quantificadas (Figura 7).

Os números de UFC de *B. canis* foram significativamente reduzidos ($p < 0,001$) no baço de camundongos imunizados com *Bo* Δ *abcBA* encapsulada em alginato (6,3 log UFC) quando comparados a camundongos inoculados com PBS estéril (7,8 log UFC). É importante ressaltar que o *Bo* Δ *abcBA* não foi recuperado do baço de camundongos imunizados. Portanto, este protocolo experimental de vacina resultou em um índice de proteção de 1,5 após o desafio com *B. canis*.

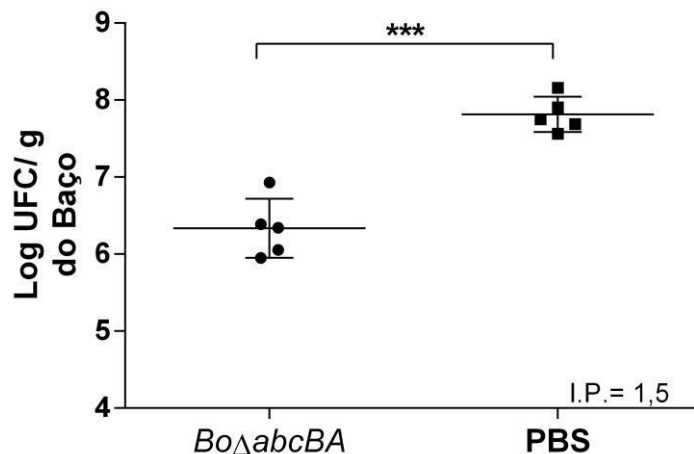


Figura 7. Log de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Brucella canis* por grama de baço de camundongos imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) encapsulada com alginato ou inoculados com PBS e desafiados com *B. canis* (10^6 /camundongos) por via intraperitoneal. Cada ponto representa um camundongo e as barras indicam a média e o desvio padrão de UFC do grupo. As contagens bacterianas foram submetidas à transformação logarítmica e submetidos ao teste de Tukey para comparação de médias (***) $p < 0,001$). O I.P. (Índice de Proteção) indicado na figura considera a diferença na contagem de UFC entre os grupos inoculados com PBS com o grupo imunizado com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato.

Não foram observadas lesões macroscópicas significativas no fígado e no baço de camundongos imunizados e não imunizados (Figura 8). Microscopicamente, respostas inflamatórias semelhantes foram observadas no fígado e baço de camundongos imunizados e não imunizados ($p > 0,05$). No fígado, foram observados microgranulomas discretos com raros focos de necrose (Figura 9A). No baço e no fígado, foram observados infiltrado inflamatório multifocal leve a moderado composto por neutrófilos e macrófagos distribuído aleatoriamente (Figura 9B). apesar das áreas discretas em que foi constatada a presença de lesões, *B. canis* foi detectada detectada por imuno-histoquímica nos tecidos avaliados (Figura 9C).

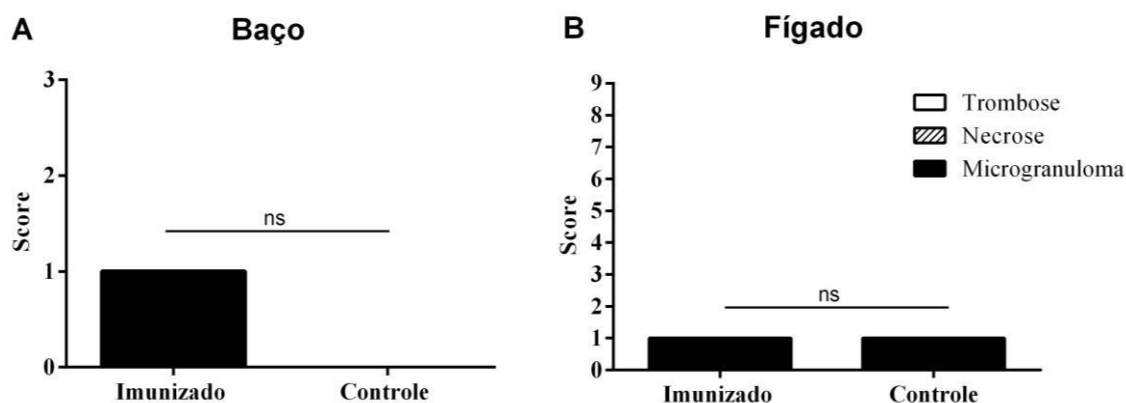


Figura 8. Escores histopatológicos de microgranulomas no Baço (A) e trombose, necrose e microgranulomas no fígado (B) de camundongos imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ (*Bo* $\Delta abcBA$) encapsulada com alginato ou inoculados com PBS e desafiados quatro semanas depois com *B. canis* (10^6 /camundongos). O fígado e o baço foram coletados duas semanas após o desafio. Os escores de lesão são classificados como 0- ausente, 1- discreto, 2- moderado e 3- intenso e comparados entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$; ns= não significativo).

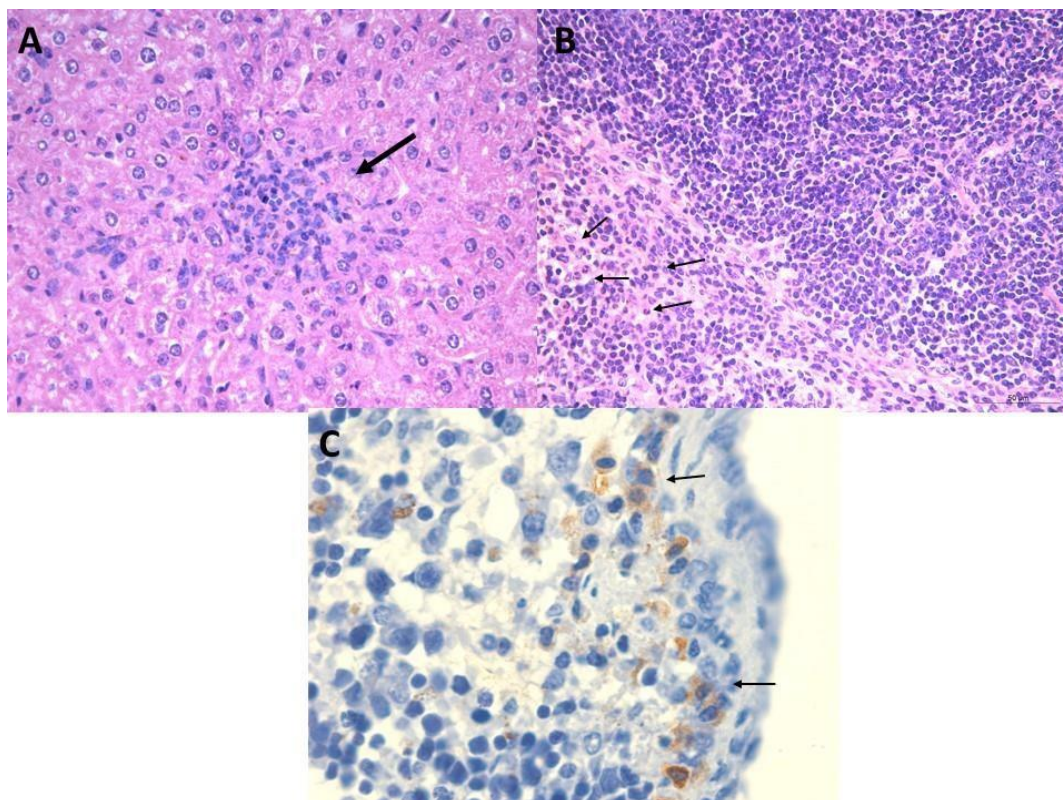


Figura 9. Alterações microscópicas representativas no fígado (A) e no baço (B) de camundongos BALB/C desafiados com *Brucella canis*. As setas indicam microgranulomas no fígado e infiltrado inflamatório no baço. Hematoxilina e eosina, 400x. Imunomarcação de *Brucella* sp. no baço de camundongos desafiados com *B. canis* (C). As setas indicam células morfologicamente compatíveis com macrófagos corados positivamente com DAB (1000x).

2.4 DISCUSSÃO

Este estudo fornece dados originais que fundamentam o desenvolvimento de uma formulação eficaz de vacina para o controle da brucelose canina. A vacinação com RB51, B19, e Rev-1 são amplamente utilizadas em bovinos, bubalinos e pequenos ruminantes (Higgins et al., 2017; Dorneles et al., 2015). No entanto, estas cepas vacinais possuem potencial patogênico para humanos e animais, interferem nos métodos sorológicos e não são indicadas no controle da brucelose canina (Higgins et al., 2017;

Poester et al., 2006). Considerando a alta conservação genética entre as espécies de *Brucella* (Michaux-Charachon et al., 1997) e a baixa patogenicidade de *B. ovis* (Atluri et al., 2011), a estratégia vacinal baseada na proteção cruzada induzida por *B. ovis* para proteção da infecção por *B. canis* aparenta ser viável e eficaz. De forma importante, não existem vacinas comerciais disponíveis para a prevenção da brucelose canina.

A estratégia de imunização desenvolvida neste estudo empregando uma cepa mutante de *B. ovis*, tem inúmeras vantagens. Esta espécie não é zoonótica, não causa doenças em outras espécies além do hospedeiro preferencial (ovinos) e possui semelhanças estruturais com *B. canis* (ambas possuem LPS rugoso). Estudos anteriores em camundongos e ovinos demonstram um grande potencial de proteção promovida pela cepa atenuada utilizada neste estudo (*BoΔabcBA*) contra a infecção por *B. ovis*, induzindo imunidade estéril em carneiros desafiados experimentalmente com o tipo selvagem de *B. ovis* (Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). É importante ressaltar que este é o primeiro estudo demonstrando indução da resposta imunológica e proteção por *BoΔabcBA* contra *B. canis*.

Curiosamente, o índice de proteção fornecido pelo *BoΔabcBA* encapsulado em alginato contra *B. canis* em camundongos (1,5) foi superior ao que foi demonstrado anteriormente em camundongos contra o desafio experimental de *B. ovis* na linhagem de camundongos BALB/C (Silva et al., 2015a). Cepas atenuadas tendem a conferir a melhor proteção contra a infecção por *Brucella* spp. quando comparado com outras estratégias vacinais como vacinas de DNA e proteínas (Carvalho et al., 2016). No entanto, vacinas contra a infecção por *B. canis* baseada em cepas mutantes atenuadas são escassas (Palomares-Rezendiz et al., 2012; Truong et al., 2015).

Este é o primeiro estudo que demonstrou a capacidade de uma espécie de *Brucella* spp. diferente de *B. canis* para invadir e multiplicar dentro de macrófagos caninos. A infecção de cães por *B. abortus* (Wareth et al., 2017), *B. suis* (Frost, 2017; Van Dijk et al., 2018), e pela cepa vacinal Rev-1 (Hinich et al., 2010) já foi relatada anteriormente, sugerindo que os cães podem desempenhar um papel na disseminação da brucelose entre animais de produção (Wareth et al., 2017). No entanto, a capacidade de outra espécie de *Brucella* com LPS rugoso (isto é, *B. ovis*) de infectar macrófagos primários de cães não foi constatada até o momento. Este estudo demonstrou que o tipo selvagem *B. ovis* invade e se multiplica dentro de macrófagos caninos, assim como *B. canis* se multiplica em macrófagos ovinos. A cepa vacinal *BoΔabcBA*, em contraste com a cepa WT, é atenuada nos macrófagos ovinos (Macedo et al., 2015) e apresenta o mesmo perfil nos macrófagos primários caninos (Figura 1). A atenuação nas células é uma característica comum das linhagens de vacinais (Truong et al., 2015). Portanto, esses resultados sustentam a noção de que a cepa atenuada de *B. ovis* pode ser adequada para ser utilizada como cepa vacinal e controlar a infecção por *B. canis*.

A capacidade de invadir macrófagos é uma característica importante para a exposição de antígenos, sendo o provável indutor da proteção cruzada contra outras espécies de *Brucella* (Truong et al., 2015), devido às semelhanças marcadamente altas entre as espécies deste gênero (Tsolis, 2002). Os camundongos imunizados com *BoΔabcBA* responderam com proliferação de esplenócitos e produção de IFN- γ em resposta a *B. ovis* ou *B. canis*, indicando claramente o potencial desta cepa vacinal em induzir uma resposta protetora cruzada contra *B. canis*.

A resposta imunológica protetora à infecção por *Brucella* está fortemente associada à produção de IFN- γ (Baldwin e Goenka, 2006; Vitry et al., 2012; Dorneles et al., 2015). Assim, a produção de IFN- γ em camundongos imunizados com *BoΔabcBA* contribuiu para o desenvolvimento de uma resposta imunológica protetora contra *B. canis*. O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória associada a lesões histológicas em camundongos e cães (Chacón-Díaz et al., 2015). No entanto, a produção de IFN- γ após a infecção por *B. canis* é menor do que em resposta a outras espécies de *Brucella* spp. (Chacón-Díaz et al., 2015), o que possivelmente está associado a lesões mais leves em camundongos desafiados com *B. canis*, quando comparado a outras espécies de *Brucella* spp. A produção de IL-10, citocina com atividade moduladora na infecção por *Brucella* spp. também foi constatada após o estímulo de *B. canis* em esplenócitos de camundongos imunizados com *BoΔabcBA*. Esta citocina atua especialmente para controlar os danos nos tecidos promovidos por citocinas pró-inflamatórias (Jimenez-deBagués et al., 2004), portanto, a produção de IL-10 pode ter contribuído para limitar a formação de lesão tecidual promovida após o desafio com *B. canis*.

Estudos recentes visando o desenvolvimento de vacinas contra *B. canis* são baseados principalmente em formulações de vacinas de subunidades proteicas, que tendem a ter proteção limitada em camundongos ou em hospedeiros naturais (Clausse et al., 2013; Clausse et al., 2014; Pollak et al., 2015; Clausse et al., 2017). Outras estratégias para o desenvolvimento da vacina contra a infecção por *B. canis* incluem lisado de *B. abortus* (Kim et al., 2018) e células inativadas de *B. canis* que envolvem a falta de conteúdo citoplasmático (Qian et al., 2017).

Considerando as limitações potenciais dessas estratégias, o uso de *B. ovis*, que tem um potencial de virulência naturalmente baixo para cães e homens, é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de uma formulação de vacina eficaz e segura para prevenir a brucelose canina.

2.5 CONCLUSÃO

Bo Δ abcBA é atenuada em macrófagos caninos. Quando encapsulada com alginato, a imunização de camundongos com *Bo Δ abcBA* protege contra a infecção por *B. canis* desafiados experimentalmente e induz resposta imunológica celular.

3. CAPÍTULO 3

Brucella ovis mutante no transportador ABC é segura para cães

3.1 INTRODUÇÃO

A brucelose canina é uma doença infectocontagiosa zoonótica, causada por *B. canis* (Carmichael, 1966). Nos cães, a brucelose canina está relacionada com alterações patológicas do sistema reprodutivo, como aborto (Carmichael, 1966), infertilidade e redução da qualidade espermática (George et al., 1979), e alterações inespecíficas como discospondilite (Forbes et al., 2019). A infecção de cães e humanos por *B. canis* têm sido detectada em todo o mundo (Lucero et al., 2010a; Hensel et al., 2018; Johnson et al., 2018), no entanto a brucelose causada por *B. canis* é considerada subestimada devido às dificuldades no diagnóstico (Mol et al., 2020) e a alta frequência de cães assintomáticos (Keid et al., 2017).

A principal forma de controle da brucelose é a vacinação. As principais vacinas comercializadas para o controle da brucelose são *B. abortus* B19, RB51, SR82 e *B. melitensis* Rev 1. Estas vacinas são amplamente utilizadas para o controle da brucelose em bovinos e bubalinos (B19, RB51, SR82) e em caprinos e ovinos (Rev 1) (Hou et al., 2019). No entanto, estas vacinas possuem residual patogênico, interferem nos métodos de diagnóstico e causam doenças nos animais e no homem (Nicoletti, 1981; Lord et al., 1998). Além disso, não são indicadas para o controle da brucelose canina.

Estudos que buscam o desenvolvimento de uma vacina para a brucelose canina são escassos e restritos à última década (Palomares-Resendiz et al., 2012; Qian et al., 2017). As estratégias vacinais adotadas incluem a utilização de vacina inativada (Qian et al., 2017), proteínas recombinantes de membrana (Omp31) e do sistema de secreção tipo IV (SST4) codificado pelo operon *virB* (Clausse et al., 2013; Clausse et al., 2014; Pollak et al., 2015), e mutantes vacinais atenuadas que incluem a mutante de *B. canis* no SST4 (Palomares-Resendiz et al., 2012) e a mutação em genes *Cyd* constituintes de um sistema ABC transportador da cepa vacinal RB51 (Truong et al., 2015). As vacinas vivas atenuadas apresentam maiores índices de proteção (Carvalho et al., 2016). No entanto, apesar da atenuação na cepa vacinal RB51 por mutação a cepa mantém seu potencial patogênico (Truong et al., 2015).

Recentemente, foi avaliado o potencial de proteção da cepa mutante *BoΔabcBA* contra a infecção por *B. canis* no modelo murino. No estudo foi observado que a cepa vacinal *BoΔabcBA* encapsulada com alginato protege contra a infecção por *B. canis* e é capaz de induzir resposta imunológica de memória, resultando em linfoproliferação e produção de INF- γ e IL-10 (dados apresentados no Capítulo 2). Além disso, esta cepa vacinal apresentou resultados satisfatórios de proteção e resposta de memória em ovinos, induzindo imunidade estéril, com ausência de patogenicidade na sua espécie-alvo (Silva et al., 2013; Silva et al., 2015b).

A patogenicidade residual das vacinas comerciais utilizadas no controle da infecção por *B. abortus* e *B. melitensis* em bubalinos e caprinos é considerada um dos entraves na utilização destas vacinas. Esta característica torna-se ainda mais relevante considerando a proximidade dos cães e do homem e, portanto, a segurança e inocuidade de uma formulação vacinal para o controle da brucelose canina é de grande importância. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar se a imunização de cães com a cepa vacinal *BoΔabcBA* encapsulada com alginato é segura e inócua para cães.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Declarações de Ética

O experimento com os cães seguiu estritamente as leis e regulamentos aplicáveis e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais CEUA-UFMG Protocolo 329/2017.

3.2.2 Crescimento bacteriano e encapsulamento de *Brucella ovis* $\Delta abcBA$

Bo $\Delta abcBA$ foi cultivada em ágar tripton de soja (TSA) com 1% de hemoglobina (Becton Dickinson, Brasil), por 3 dias a 37°C em atmosfera umidificada e com 5% CO₂. As colônias bacterianas foram ressuspensas em PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4, Sigma-Aldrich, USA), e a concentração do inóculo foi estimada por espectrofotometria (SmartSpec Plus Bio-Rad) fazendo a leitura em 600 nm (OD₆₀₀).

O encapsulamento de *Bo* $\Delta abcBA$ foi realizado como previamente descrito por Silva et al. (2015b). Suspensão bacteriana de *Bo* $\Delta abcBA$ contendo 1×10^{10} UFC/mL em PBS foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min a 21°C, e então ressuspensa em solução de alginato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) 1% (alginato de sódio 1,5%; 10 mM ácido morfolinepropanesulfônico - MOPS; NaCl 0,85%). Esta mistura foi colocada em seringa de 1 mL e gotejada com agulha de 33G (0,23 x 4 mm) (TKS Lab, Japão), em solução de polimerização (100 mM CaCl₂; 10 mM MOPS; 0,85% NaCl) sob homogeneização constante a 18-21°C. Após 15 min, as cápsulas foram lavadas duas vezes com solução de MOPS (MOPS 10 mM; NaCl 0,85%), e então incubadas com Poli-L-Lisina 0,05% (Sigma-Aldrich, EUA) diluída em solução de polimerização e mantido a 18-21°C por 15 min sob homogeneização lenta. As cápsulas foram então homogeneizadas em solução de MOPS e suspensas em alginato de sódio a 0,03%. O alginato foi removido e as cápsulas foram inoculadas nos cães.

3.2.3 Desenho experimental e imunização dos cães

Dez cães sem raça definida de 1 a 2 anos de idade (5 fêmeas e 5 machos) provenientes do canil experimental do ICB- UFMG (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais) foram testados previamente duas vezes (30 dias antes do início do experimento), com intervalos de 15 dias, para detecção de infecção por *B. canis* por avaliação clínica, isolamento bacteriano e PCR para *Brucella* spp. (Baily et al., 1992), utilizando amostras de sangue, sêmen, urina e *swab* vaginal. Os cães também foram testados sorologicamente pelo IDGA. Esses cães foram considerados livres de *Brucella* e foram divididos em dois grupos: um inoculado com cápsulas estéreis de alginato (n = 5; 3 fêmeas e 2 machos) e o outro imunizado com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (n = 5; 2 fêmeas e 3 machos). Os cães foram monitorados permanentemente por um veterinário e mantidos com água e alimentos *ad libitum* durante todo o experimento.

Os cães foram inoculados subcutaneamente na região escapular dorsal com 1 mL de cápsulas estéreis ou com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulada em alginato (1×10^9 UFC). Após a imunização, os cães foram avaliados clinicamente em 1, 2, 3, 5 e 9 dias e depois a cada duas semanas após a imunização. Amostras de sangue, urina e *swab* vaginal de fêmeas ou sêmen de machos foram coletados a cada duas semanas após a imunização e submetidos à análise hematológica, isolamento bacteriano e PCR. Para avaliação clínica, os cães foram mantidos sob estação com manipulação mínima para evitar mudanças de comportamento e temperatura. O estado de alerta, apetite, peso, edemaciação no local da imunização (medido com cutímetro), temperatura retal e alterações no volume e consistência dos linfonodos superficiais (mandibular, cervical superficial, inguinal e poplítea) foram registradas. O sistema reprodutivo foi avaliado pela observação de secreções vaginais nas fêmeas, e nos machos pela inspeção,

palpação dos testículos e epidídimos e avaliação de parâmetros seminais como motilidade, motilidade progressiva, concentração e vigor e presença de células inflamatórias no sêmen (CBRA, 2013).

Amostras de sangue foram coletadas da veia jugular sem anticoagulante e o soro foi obtido por centrifugação a 3.000 x g por 15 min. O soro foi coletado e armazenado a -20°C para detecção de anticorpos por IDGA. Para análise bioquímica foram utilizadas amostras de plasma, obtidas por centrifugação de sangue total coletadas com anticoagulante a 3.000 x g por 15 min. As amostras de plasma foram congeladas a 20°C até o momento da realização da análise.

As amostras de sangue coletadas em citrato de sódio foram submetidas à análise hematológica, isolamento bacteriano e PCR. Foram obtidos dois *swabs* vaginais de cada fêmea, ressuspensos em 1 mL de PBS estéril e submetidos à extração de DNA e isolamento bacteriano. As amostras de sêmen foram coletadas diretamente em tubos cônicos estéreis de 15 mL, conforme descrito pelo CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal). As amostras de urina foram coletadas utilizando cateteres estéreis em tubos estéreis de 15 mL, concentrados por centrifugação a 4.000 x g por 10 min, ressuspensos em 2 mL de urina sobrenadante e submetidos à extração de DNA e isolamento bacteriano.

Vinte e duas semanas após a imunização, os cães imunizados com *BoΔabcBA* encapsulados em alginato foram submetidos à eutanásia e necropsia. Para a eutanásia os cães foram previamente anestesiados com Tiopental de Sódio (35mg/kg, iv) seguido de injeção intravenosa de solução saturada de cloreto de potássio. O procedimento foi realizado por médico veterinário e seguido imediatamente da necropsia.

Amostras de pele (no local da imunização), linfonodos (retromandibular, axilar, inguinal, poplíteia, subescapular e cervical), baço, fígado, pâncreas, estômago, bexiga urinária, rins, uretra, ureter, testículos/ovários, epidídimos, próstata/útero, pênis, sistema nervoso central, coração, pulmão e medula óssea foram coletados em tubos estéreis contendo 2 mL de PBS, homogeneizados e submetidos a isolamento bacteriano e PCR. As amostras desses órgãos também foram processadas para histopatologia.

3.2.4 Sorologia

A avaliação sorológica foi realizada pelo kit de IDGA (TECPAR, Brasil) com antígeno de lipopolissacarídeo e proteínas de *B. ovis*. Para a realização do teste, solução de agarose a 1% contendo 0,1 M de tampão borato (pH 8,0) com 1 M de NaCl foram adicionados à lâminas de vidro, que após a polimerização foram perfurados 7 poços, sendo um poço central onde foi adicionado o antígeno e outros 6 poços onde foram adicionadas amostras de soro (3 poços) a serem testadas, intercaladas com soros controle positivo (fornecidos pelo fabricante). As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 72 h, quando foi realizado o diagnóstico, e são consideradas positivas as amostras que formam linhas de precipitação semelhantes ao controle.

3.2.5 Isolamento bacteriano

Para avaliar se os cães estavam livres de *B. canis*, amostras de sangue, urina, *swab* vaginal ou sêmen de cães incluídos no estudo foram inoculados em ágar triptose (BD Difco, EUA) sem ou com suplementação seletiva (2.500 UI de polimixina B; 12.500 UI bacitracina; 50.000 UI de nistatina; 50 mg de ciclo-hexamida; 2,5 mg de ácido nalidíxico; e 10 mg de vancomicina) (Sigma Aldrich, EUA) e em 10 mL de caldo de triptose (BD Difco, EUA), contendo suplemento seletivo. As culturas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e o crescimento de colônias bacterianas foi verificado a cada 48 h por 21 dias. Após 7 dias em cultura, 100 µL de caldo foram semeados em ágar triptose, e mantidos a 37°C com 5% de CO₂

por 21 dias. Este procedimento foi realizado duas vezes antes da imunização com intervalo de 15 dias entre coletas.

Para isolamento bacteriano ao longo do experimento, 100 µL de sangue total, sêmen, urina ou *swab* vaginal foram semeados em ágar Thayer Martin com 1% de hemoglobina, com ou sem canamicina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 21 dias.

Para isolamento das amostras de tecido, os fragmentos coletados durante a necropsia foram homogeneizados individualmente com homogeneizador de tecidos (CB, Biotech, Brasil) e semeados em ágar Thayer Martin com 1% de hemoglobina com ou sem canamicina (100 µg/mL) e incubados a 37°C com 5% de CO₂ por 21 dias. As colônias bacterianas obtidas no isolamento e caracterizadas como suspeitas foram mortas pelo calor (100°C por 30 min) e submetidas à PCR para confirmação.

3.2.6 Extração de DNA e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A extração de DNA de sêmen e urina foi realizada pelo método da proteinase K e fenol/clorofórmio, com 500 µL e 1 mL, de sêmen e urina, respectivamente (Matrone et al., 2009). A extração de DNA a partir de *swab* vaginal e sangue foi realizada pelo método da guanidina (Pitcher et al., 1989), com 250 µL de cada amostra. Após a extração do DNA, as amostras foram armazenadas a -20°C. A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria (SmartSpec, BioRad, EUA).

Todas as amostras foram submetidas a um PCR genérico (Baily et al., 1992) visando o gene *bcs31* de *Brucella* spp. Para cada reação, 200-500 ng de DNA extraído foram adicionados a 18,5 µL de Supermix PCR (Tris-HCl 22 mM pH 8,4, KCl 55 mM, cloreto de magnésio 1,65 mM, dGTP 220 µM, dATP 220 µM, dTTP 220 µM, 220 dCTP µM e 22 U/mL de Taq DNA polimerase recombinante; Invitrogen, EUA) e 1,0 µL de cada iniciador (10 µM) em volume total de 25 µL. Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 3 min; 40 ciclos (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos) e 72°C por 10 min.

Para identificar a cepa da vacina, amostras que foram positivas no PCR genérico para *Brucella* spp. foram submetidos a um PCR espécie específico para detectar *B. ovis* (Xavier et al., 2010), seguido de um PCR para detectar a cepa vacinal *BoΔabcBA* (Silva et al., 2015b). Para detecção de *B. ovis*, 200-500 ng de DNA extraído foi adicionado a 23 µL de SuperMix PCR (Invitrogen, EUA) com 0,5 µL de cada primer (25 µM). Os parâmetros de ciclagem foram: 95°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos a 95°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Reagentes e reações semelhantes foram utilizados para detectar a cepa da vacina, exceto pela adição de 0,25 µL de Taq DNA polimerase e extensão a 72°C por 2 min e 30 seg e extensão final a 72°C por 7 min.

O DNA extraído de culturas puras de *B. ovis* foi usado como controle positivo para a detecção genérica e específica de *B. ovis* ou *BoΔabcBA*. Nos controles negativos, o DNA foi substituído por água. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com SYBRSafe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) e examinados em um transiluminador de luz ultravioleta. Todos os iniciadores e produtos esperados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de iniciadores utilizados para detecção de *Brucella* spp., *Brucella ovis* e *BoΔabcBA* pela PCR.

Alvo	Senso (5'-3')	Anti-senso (5'-3')	pb	Referência
<i>Brucella</i> spp.	TGGCTCGGTTGCCAATA	CGCGCTTGCCTTTCAAGGT	223	Baily et al. (1992)
	TCAA	CTG		
<i>Brucella ovis</i>	GCCTACGCTGAAACTTG	ATCCCCCATCACCATAA	228	Xavier et al. (2010)
	CTTTTG	CCGAAG		
<i>BoΔabcBA</i>	GGCCCGGTTTTCTGTCTC	TCATCACGGTACTTGGGCT	174	Silva et al. (2015)
	CAA	C		

pb = pares de base.

3.2.7 Análise hematológica e bioquímica

Os parâmetros hematológicos (leucócitos, eritrócitos, plaquetas, hematócrito, eosinófilos e células segmentadas) foram mensurados com analisador automático (PocH-100iV – Sysmex, Japan). Kits comerciais (Kovalent, Brazil) foram utilizados para mensurar alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), ureia, creatinina, fosfatase alcalina, bilirrubina e alfa-amilase. As leituras foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Cobas Mira, Roche, Suíça).

3.2.8 Avaliação de parâmetros seminais

O sêmen foi coletado em tubo Falcon de 15 mL estéril, avaliado quanto ao volume cor. Para avaliação de motilidade, uma gota do ejaculado mantido a 37°C foi dispensada em lâmina de vidro e coberto com lamínula (previamente aquecidos a 37°C) e avaliado em microscopia óptica. Uma alíquota do ejaculado foi diluído em salina (1:20) e em seguida avaliado em microscopia óptica em Câmara de Neubauer para determinação da motilidade, motilidade progressiva, vigor e concentração (CBRA, 2013).

Para determinar a presença de células inflamatórias no sêmen foi confeccionado o esfregaço com uma gota de sêmen, corada com Panótico rápido em duplicata para cada reprodutor, avaliado por microscopia óptica de campo claro (400 X). O infiltrado inflamatório foi classificado pelo tipo celular presente e predominante, e pela intensidade de células por campo microscópico (Carvalho Junior et al., 2012). O infiltrado inflamatório foi classificado como 0 (ausente), 1 (discreto- até cinco células por campo), 2 (moderado- de seis a 15 células por campo) e 3 (intenso- acima de 15 células por campo).

3.2.9 Histopatologia

Os tecidos foram fixados por 24 h imediatamente após a eutanásia por imersão em formalina 10% tamponada ou solução de Bouin (para testículos e epidídimos). Em seguida foram desidratados em concentrações crescentes de álcool: álcool 70% por 1 h, álcool 80% por 40 min, álcool 90% por 40 min e duas passagens em álcool absoluto de 1 h cada. Em seguida os fragmentos foram mantidos em xilol por dez min e embebidos em parafina por cinco min. Os fragmentos foram emblocados com parafina e posteriormente foram obtidas secções de 3 a 5 µm em micrótomo histológico. Secções de 4 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados em microscopia óptica.

3.2.10 Análise Estatística

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os escores histopatológicos foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A frequência de amostras positivas no IDGA, isolamento bacteriano e PCR foram comparadas pelo teste exato de

Fisher. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prism software versão 5.0, EUA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 A cepa vacinal *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ não causou alterações clínicas e locais nos cães imunizados

Considerando a resposta imunológica e a proteção fornecida pela cepa da vacina *Bo* $\Delta abcBA$ em camundongos, neste Capítulo foi avaliada a segurança da cepa da vacina para cães, o hospedeiro natural de *B. canis* e a espécie-alvo para vacinação. Nenhum dos cães imunizados ou controle desenvolveu qualquer sinal clínico compatível com a infecção por *Brucella* spp. É importante ressaltar que não houve alterações no volume e consistência dos linfonodos, testículos e epidídimo ao longo do experimento, assim como não houve descargas vaginais nas fêmeas.

A febre é um importante marcador de inflamação em cães. A Figura 10A demonstra a temperatura retal dos cães controle e imunizados com *Bo* $\Delta abcBA$. É importante ressaltar que não houve diferenças significativas na temperatura retal quando os cães imunizados foram comparados aos controles. A reação no local da inoculação aumentou até 3 dias após a imunização (dpi) em cães imunizados com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulado em alginato e regrediu progressivamente até 4 semanas após a imunização (Figura 10B). É importante ressaltar que os cães inoculados com cápsulas estéreis de alginato não desenvolveram reação no local da inoculação em nenhum momento do estudo.

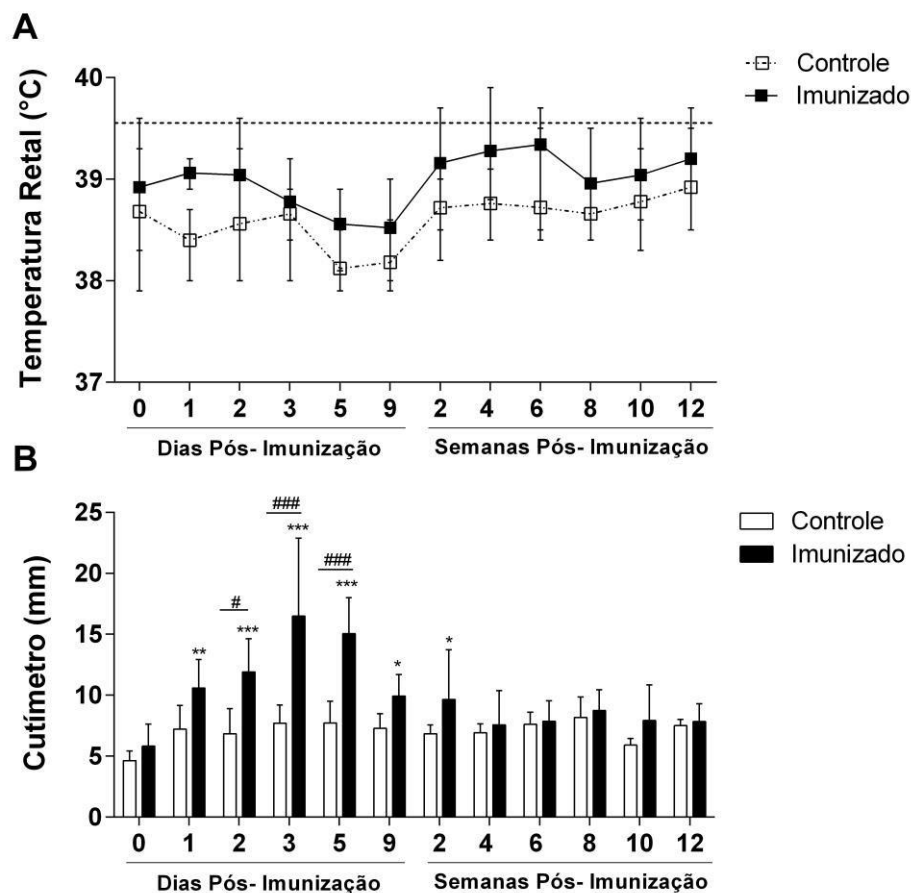


Figura 10. Temperatura retal (A) e edemaciação no local da inoculação (B) em cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (Imunizado; n = 5) ou

inoculados com cápsulas estéreis de alginato (Controle; $n = 5$). Cada ponto de dados da temperatura retal representa a média e a barra representa a temperatura máxima e mínima. A linha tracejada indica o limite superior da faixa de temperatura considerada normal ($39,5^{\circ}\text{C}$; Lunn, 2001). Em B, as colunas representam a média da edemaciação em cães imunizados com *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (Imunizado; $n = 5$) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (Controle; $n = 5$), e a barra indica o desvio padrão (SD). Os dados foram submetidos à ANOVA, as médias foram comparadas entre grupos em um determinado tempo utilizando o teste de comparações múltiplas de Sidak ($\# = p < 0,05$; $### = p < 0,001$) ou comparados em diferentes tempos com o dia 0 pelo teste de Tukey ($* = p < 0,05$; $** = p < 0,01$; $*** = p < 0,001$).

3.3.2 A imunização não alterou o perfil hematológico e bioquímico em cães

Não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos de cães controle ou imunizados em nenhum momento (Figura 11), com valores permanecendo dentro do intervalo de referência (Tabela Suplementar 2). Além disso, não houve alterações significativas na contagem diferencial de leucócitos ao longo do curso do experimento (Tabela Suplementar 3).

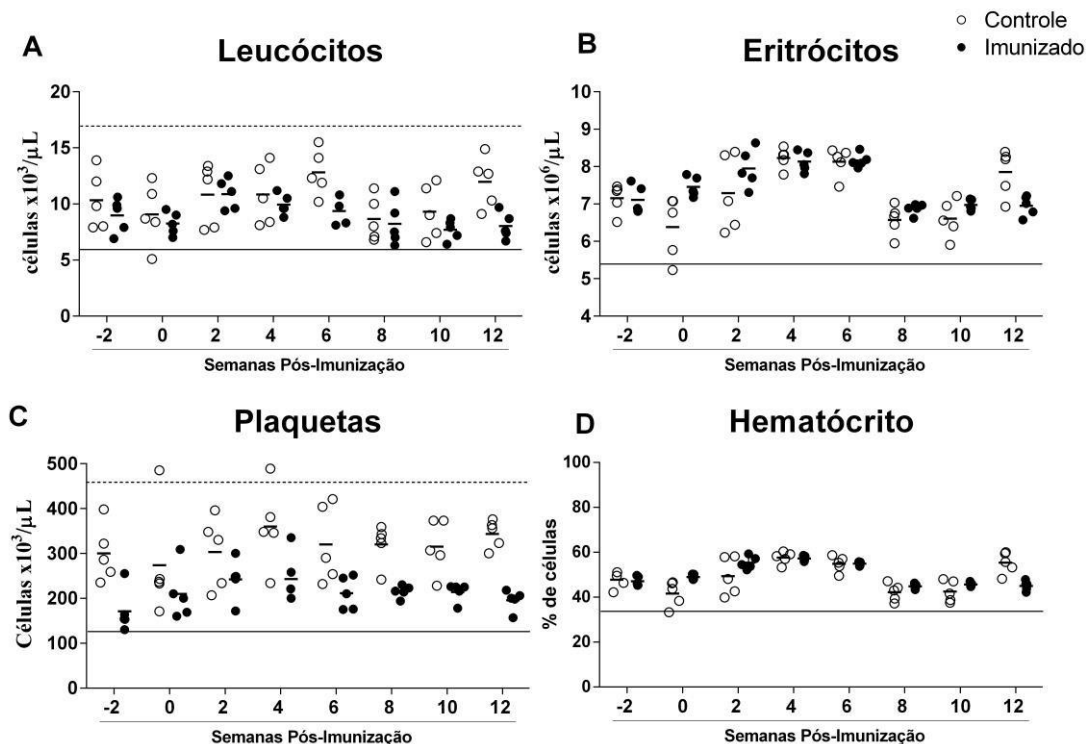


Figura 11. Parâmetros hematológicos de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulados em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). As linhas horizontais indicam o número médio de leucócitos (A), eritrócitos (B), plaquetas (C) e hematócrito (D). Os valores individuais são indicados por círculos abertos (Controle) ou pontos fechados (Imunizados). Os valores de referência são indicados pela linha tracejada (limite superior) e uma linha contínua (limite inferior).

O perfil bioquímico dos cães controle e imunizados estão representados na Figura 12. Não foram observadas alterações significativas em ALT, AST, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, bilirrubina e alfa amilase.

Não houve alterações significativas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães neste estudo, sem diferenças significativas entre cães imunizados e controle ($p > 0,05$). Estes resultados indicam que a imunização com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulado com alginato, bem como o alginato sozinho, não teve nenhum efeito deletério nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães imunizados.

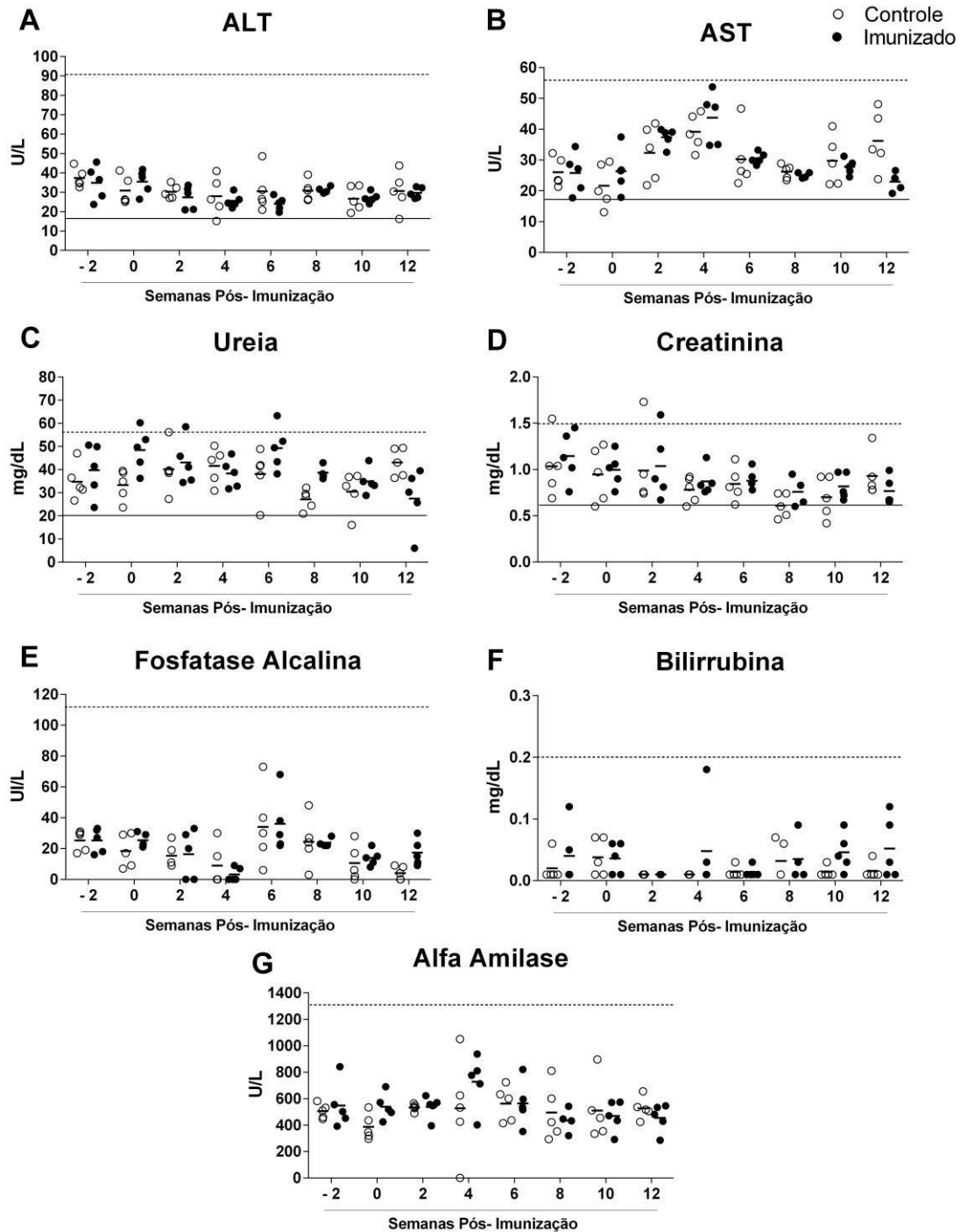


Figura 12. Parâmetros bioquímicos das funções hepáticas, renais e pancreáticas de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulado em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). Linhas horizontais indicam o valor médio de ALT (alanina aminotransferase) (A), AST (aspartato aminotransferase) (B), fosfatase alcalina (C),

bilirrubina total (D), ureia (E), creatinina (F) e alfa amilase (G) medido por análise colorimétrica. Os valores individuais são representados por círculos abertos para controle e pontos fechados para cães imunizados. Os valores de referência são indicados pela linha tracejada e pela linha continuada (Tabela Suplementar 2).

3.3.3 *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ não causa alterações genitais e não é eliminada por cães imunizados

Não houve alterações clínicas genitais em cães imunizados ou animais de controle inoculados com cápsulas estéreis de alginato. Os parâmetros seminais avaliados: motilidade, motilidade progressiva, vigor e concentração espermáticos estão representados na Figura 13. Não foram observadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros em cães do grupo controle e imunizado em nenhum período avaliado. Não foi detectado um aumento na presença de células inflamatórias no ejaculado de cães imunizados com *Bo* $\Delta abcBA$ encapsulados em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle) (Tabela 3).

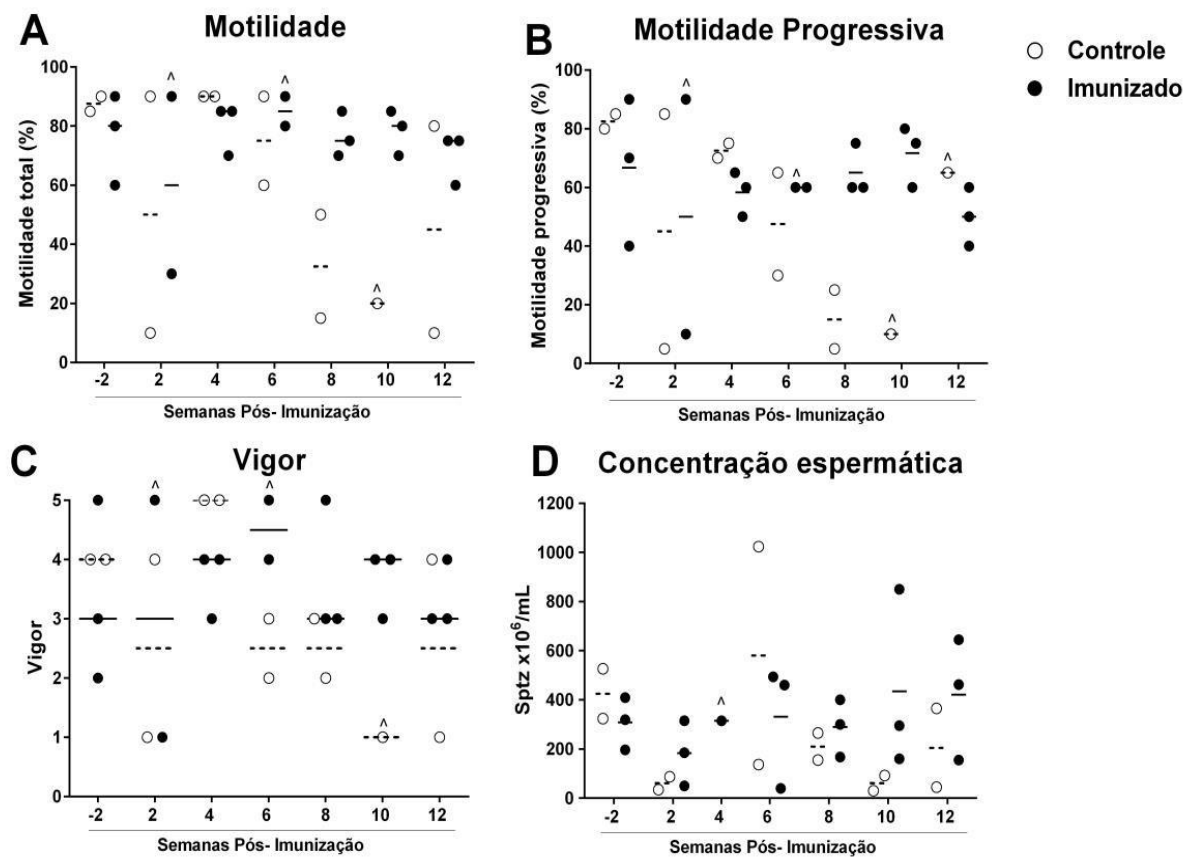


Figura 13. Parâmetros espermáticos de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulados em alginato (imunizados) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). Linhas horizontais tracejadas e contínuas indicam o valor da mediana para o grupo controle e imunizado, respectivamente para os parâmetros de motilidade (A), motilidade progressiva (B) vigor (C) e concentração espermática (D); os valores individuais são indicados por círculos abertos (controle) ou pontos fechados (imunizados). [^]Indica que não foi possível avaliar amostra de sêmen de todos os cães do grupo indicado.

Tabela 3. Células inflamatórias no ejaculado de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulados em alginato (imunizado) ou inoculados com cápsulas estéreis de alginato (controle). O infiltrado inflamatório foi classificado como 0 (ausente), 1 (discreto- até cinco células por campo), 2 (moderado- de seis a 15 células por campo) e 3 (intenso- acima de 15 células por campo).

Grupo	Animal	Semanas Pós-infecção						
		-2	2	4	6	8	10	12
Controle	2A	1	1	0	0	0	0	0
	2D	0	1	0	0	0	0	0
	1D	0	0	0	0	0	0	1
Imunizado	2B	0	0	0	0	1	0	0
	2C	0	0	0	0	0	0	0

O isolamento bacteriano e a PCR para a detecção de *Bo* $\Delta abcBA$ foram realizados com sangue, urina, sêmen e *swab* vaginal a cada 2 spi em cães imunizados e controles. *Bo* $\Delta abcBA$ não foi isolado ou detectado por PCR durante todo o curso do experimento. Portanto a cepa vacinal não foi detectada no sangue e não é eliminada pela urina, sêmen ou secreções vaginais.

Cães imunizados foram submetidos à eutanásia a 22 spi e amostras de pele (local da inoculação), linfonodos (retromandibular, axilar, inguinal, poplítea, subescapular e cervical), baço, fígado, pâncreas, estômago, bexiga e rim (direita e esquerda), uretra, ureter, testículos/ovário (direito e esquerdo), epidídimo (direito e esquerdo), próstata/útero, pênis, sistema nervoso central, coração, pulmão e medula óssea.

Não foram observadas alterações patológicas (macroscópicas ou microscópicas) (Figura 14) em cães imunizados. Todas as amostras de tecido de todos os cães imunizados foram negativas para *Brucella* spp. por PCR. Curiosamente, *Bo* $\Delta abcBA$ foi isolado de linfonodos subescapulares e cervicais (próximo ao local da inoculação) de dois cães imunizados.

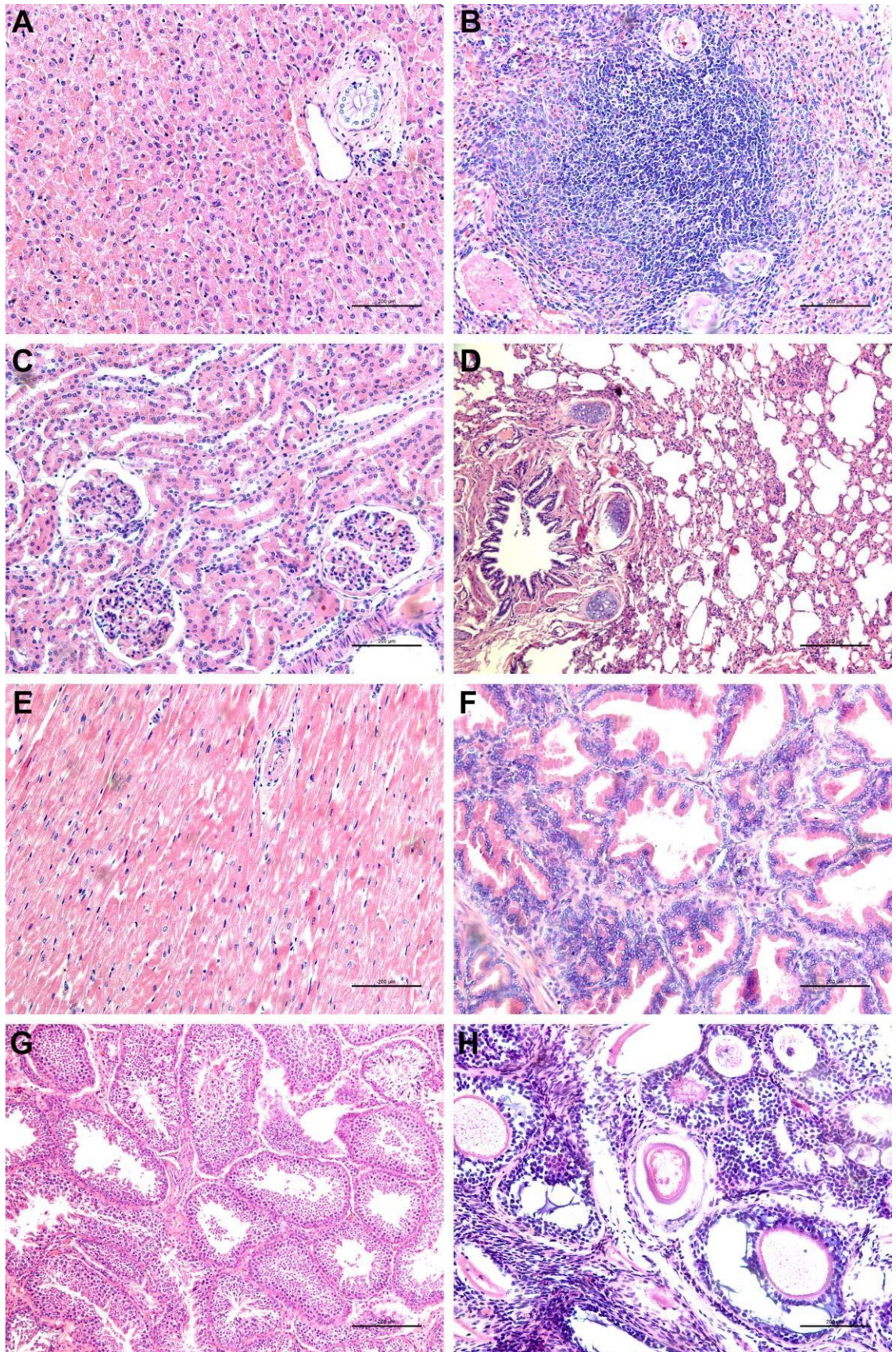


Figura 14. Ausência de alterações microscópicas no (A) Fígado, (B) Baço, (C) Rim,

(D) Pulmão, (E) Coração, (F) Próstata, (G) Testículo e (H) Ovário (HE 400x) de cães machos e fêmeas imunizados por via subcutânea com 10^9 UFC de *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato e submetidos à eutanásia 22 semanas após a imunização.

3.3.4 Imunização com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ induziu resposta humoral em cães Duas semanas após a imunização, 60% (3/5) dos cães imunizados tinham anticorpos detectáveis contra *Brucella* spp. com LPS rugoso pelo IDGA. A 4 semanas após a imunização, 80% dos cães imunizados (4/5) tinham anticorpos contra *Brucella* spp. com LPS rugoso. É importante ressaltar que a 4 semanas após a imunização todos os cães imunizados tiveram anticorpos detectáveis em pelo menos um momento após a imunização, indicando que todos os cães imunizados soroconverteram (Tabela 4). Nenhum dos cães de controle negativo que foram inoculados com alginato estéril desenvolveu anticorpos anti-*Brucella* spp. com LPS rugoso, indicando que o alginato não interferiu nessa análise sorológica (Tabela 4).

Tabela 4. Soroconversão de cães imunizados com *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (Imunizado) ou inoculados com cápsulas de alginato estéril (Controle), avaliados por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) antes e após a imunização.

Grupo	Animal	Semanas Pós-infecção							
		-2	0	2	4	6	8	10	12
Controle	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Imunizado	6	-	-	+	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	+	+	+	+	+
	8	-	-	+	+	+	+	+	+
	9	-	-	-	+	+	+	+	+
	10	-	-	+	+	+	+	+	+
P		ns	ns	ns	*	*	*	*	*

0 indica o momento da imunização; ns: Não significativo estatisticamente; -: resultado negativo, +: resultado positivo; * diferença estatística pelo teste exato de Fisher ($p < 0.05$).

3.4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes para o controle da infecção por *Brucella* spp. têm sido amplamente estudado (Schurig et al., 2002; Hou et al., 2019). As vacinas vivas atenuadas, as quais têm apresentado melhor potencial de proteção contra a infecção por *Brucella* spp. (Carvalho et al., 2016), raramente tem sido estudada no desenvolvimento de vacinas para o controle da brucelose canina (Palomares-Resendiz et al., 2012; Truong et al., 2015). Visto a grande importância da brucelose canina, o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz no controle da brucelose canina é essencial para o controle da doença nos cães, evitando assim infecção humana por *B. canis*. Além disso, a utilização de uma vacina não patogênica minimiza os riscos do desenvolvimento de doença causada pela cepa vacinal, como comumente ocorre com as vacinas utilizadas em bovinos e bubalinos (Higgins et al., 2017; Poester et al., 2006).

A *B. ovis* é uma espécie de *Brucella* com LPS naturalmente rugoso (similar a *B. canis*), não zoonótica (Xavier et al., 2009; Byndloss e Tsolis, 2016). A mutação da *B. ovis* no sistema ABC transportador (*Bo* $\Delta abcBA$) confere a atenuação em células (dados apresentados

no capítulo anterior) e *in vivo* (Silva et al., 2014; Silva et al., 2015), e confere proteção contra a infecção pela cepa selvagem de *B. ovis* em camundongos (Silva et al., 2015a) e ovinos (Silva et al., 2013; Silva et al., 2015b). A cepa vacinal *BoΔabcBA* encapsulada com alginato confere proteção cruzada contra a infecção por *B. canis* e induz a resposta de memória em camundongos (Capítulo 2). A soroconversão dos cães imunizados com a cepa vacinal *BoΔabcBA* encapsulada com alginato indica que esta cepa é capaz de induzir resposta de memória em 2 semanas após a infecção com persistência mínima de até 12 semanas após a imunização para a produção de anticorpos detectados no IDGA, corroborando com a resposta de memória observada em camundongos imunizados (capítulo anterior).

O alginato é um polissacarídeo produzido naturalmente por algas marinhas marrons (Andrade et al., 2004). O encapsulamento da cepa vacinal *BoΔabcBA* com este biopolímero promove a liberação lenta e gradativa do antígeno (Kahl-McDonagh e Ficht, 2006). Tradicionalmente, os biopolímeros são considerados inertes e não possuem interação com o organismo, tornando assim uma estratégia segura para sua utilização como sistema de apresentação antigênica (Severino et al., 2019). A utilização do alginato possui algumas vantagens, como: não acumulação nos tecidos, biodegradabilidade, encapsulamento em temperatura ambiente (mantendo a estabilidade bacteriana e de moléculas protéicas) e liberação lenta da cepa vacinal (Severino et al., 2019), o que permite a apresentação antigênica por tempo prolongado. A ausência da produção de anticorpos em cães imunizados com cápsulas vazias de alginato indica que este biopolímero não interfere na resposta imune e que a produção de anticorpos é decorrente da presença da cepa *BoΔabcBA*.

É importante ressaltar que aqui demonstramos que a cepa vacinal *BoΔabcBA* não causou lesões ou doenças em cães imunizados, assim como não foi detectada pela PCR e não foi isolada em amostras de sangue, sêmen, urina e *swab* vaginal indicando que a cepa vacinal não é eliminada no ambiente. As vacinas comerciais contra a brucelose bovina são geralmente administradas a fêmeas jovens e não gestantes, porque essas cepas de vacina possuem virulência residual e podem causar aborto em mulheres gestantes (Poester et al., 2006) ou orquite e epididimite nos machos (Lalsiamthara e Lee, 2017). Em contrapartida, o *BoΔabcBA* não induziu nenhuma alteração clínica em cães imunizados machos e fêmeas.

Considerando as limitações potenciais dessas estratégias, o uso de *B. ovis*, que tem um potencial de virulência naturalmente baixo para cães e homens, é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de uma formulação de vacina eficaz e segura para prevenir a brucelose canina.

3.5 CONCLUSÃO

A *BoΔabcBA* encapsulada com alginato induz soroconversão em cães imunizados e não causa alterações patológicas nos cães. De forma importante, a cepa vacinal não é encontrada em amostras de sangue e não é eliminada pelo sêmen, secreção vaginal e urina dos cães imunizados. Além disso, a imunização dos cães com *BoΔabcBA* encapsulada com alginato não resulta em alterações bioquímicas e hematológicas. Portanto, a cepa vacinal *BoΔabcBA* encapsulada com alginato é segura e inócua em cães.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, K.; PEÑA, A.; LÓPEZ, G.; et al. Tenencia y estado de salud de mascotas de niños inmunocomprometidos, com ênfasis em enfermidades zoonóticas. *Rev. Chil. Infectol.*, v.28, n.3, p.205-210, 2011.

ABKAR, M.; FASIHI-RAMANDI, M.; KIISHKI, H.; et al. Oral immunization of mice with Omp31-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles induces high protection against *Brucella melitensis* infection. *Int. J. Nanomedicine*, v.12, n.1, p.8769-8778, 2017.

ADESIYUN, A.A.; ABDULLAHI, S.U.; ADEYANJU, J.B. Prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella canis* antibodies in dogs in Nigeria. *J. Small Anim. Pract.*, v.27, n.1, p.31-37, 1986.

AGUELDO-FLÓREZ, P.; CASTRO, B.; ROJO-OSPINA, R.; et al. Canine brucellosis: Seroprevalence and risk factors in pets from eleven neighbourhoods in Medellin, Colombia. *Rev. Salud Pública*, v.14, n.4, p.644-656, 2012.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.C.; VASCONCELLOS, S.A.; et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Ciênc. Rural*, v.35, n.5, p.1216-1219, 2005.

AKHTARDANESH, B.; GHANBARPOUR, R.; BABAEI, H.; NAZER, M. Serological evidences of canine brucellosis as a new emerging disease in Iran. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, v.1, n.3, p.177-180, 2011.

AL DAHOUK, S.; LE FLECHE, P.; NOCKLER, K.; et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods*, v.69, n.1, p.137-145, 2007.

ALLEN, C.A.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect. Immun.*, v.66, n.3, p.1008-1016, 1998.

ALMEIDA, A.C.; SANTORELLI, A.; BRUZADELLI, R.M.Z.; et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.2, p.275-276, 2004.

AL-TAWFIQ, J.A. Therapeutic options for human brucellosis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, v.6, n.1, p.109-120, 2008.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. Laboratory techniques in brucellosis. WHO Monograph Series n. 55. Geneva, Switzerland: WHO. 1975, 188p.

ANDERSON, G.I.; BINNINGTON, A.G. Discospondylitis and orchitis associated with high *Brucella* titre in a dog. *Can. Vet. J.*, v.24, n.8, p.249-252, 1983.

ANDRADE, L.R.; SALGADO, L.T.; FARINA, M.; et al. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *J. Struct. Biol.*, v.145, n.3, p.216-225, 2004.

- ANGEL, M.O.; RISTOW, P.; KO, A.I.; DI-LORENZO, C. Serological trail of *Brucella* infection in an urban slum population in Brazil. *J. Infect. Develop. Ctries.*, v.6, n.9, p.675-679, 2012.
- ARAS, Z.; UÇAN, U.S. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. *Theriogenology*, v.74, n.4, p.658-662, 2010.
- ATLURI, V.L.; XAVIER, M.N.; DE JONG, M.F.; et al. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.65, n.1, p.523-541, 2011.
- AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ALVES, C.J.; et al. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.23, n.4, p.156-160, 2003.
- AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, A.S.; KEID, L.B.; et al. Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.41, n.2, p.106-112, 2004.
- BABAMAHOODI, F.; BABAMAHOODI, A. Brucellosis, presenting with Guillain-Barré syndrome. *J. Glob. Infect. Dis.*, v.3, n.4, p.390-392, 2011.
- BADAKHSH, F.; CARMICHAEL, L.; DOUGLASS, J. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.15, n.2, p.286-289, 1982.
- BAEK, B.K.; LIM, C.W.; RAHMAN, M.S.; et al. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Can. J. Vet. Res.*, v.67, n.4, p.312-314, 2003.
- BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.95, n.4, p.271-275, 1992.
- BALDI, P.C.; WANKE, M.M.; LOZA, M.E.; FOSSATI, C.A. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.41, n.1-2, p.127-134, 1994.
- BALDI, P.C.; WANKE, M.M.; LOZA, M.E.; et al. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18kDa cytoplasmatic protein of *Brucella* spp. *Vet. Microbiol.*, v.57, n.2-3, p.273-281, 1997.
- BALDWIN, C.L.; GOENKA, R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection. *Crit. Rev. Immunol.*, v.26, n.5, p.407-442, 2006.
- BANAI, M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.497-519, 2002.
- BARKHA, S.; KUMAR, S.D.; KUMAR, S.D. Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis.

Asian Pac. J. Trop. Med., v.4, n.11, p.857-861, 2011.

BEHZADI, M.A.; MOGHEISEH, A. Outbreak investigation of brucellosis at a kennel in Iran. *Pakistan Vet. J.*, v.31, n.4, p.379-380, 2011.

BIGDELI, M.; NAMAVARI, M.M.; MOAZENI-JULA, F.; et al. First study prevalence of brucellosis in stray and herding dogs south of Iran. *J. Anim. Vet. Adv.*, v.10, n.10, p.1322-1326, 2011.

BLASCO, J.M.; DÍAZ, R. *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*, v.342, n.8874, p.805, 1993.

BOEBEL, F.W.; EHRENFORD, F.A.; BROWN, G.M.; et al. Agglutinins to *Brucella canis* in stray dogs from certain counties in Illinois and Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.175, n.3, p.276-277, 1979.

BOERI, E.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M.; et al. Canine brucellosis in dogs in the city of Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*, v.68, n.4, p.291-297, 2008.

BOSU, W.T.; PRESCOTT, J.F.A. serological survey of dogs for *Brucella canis* in southwestern Ontario. *Can. Vet. J.*, v.21, n.7, p.198-200, 1980.

BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHÉNAIS, B.; et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs31* and per target genes. *Vet. Microbiol.*, v.137, n.1-2, p.156-164, 2009.

BRENNAN, S.J.; NGELEKA, M.; PHILIBERT, H.M.; et al. Canine brucellosis in a Saskatchewan kennel. *Can. Vet. J.*, v.49, n.7, p.703-708, 2008.

BRICKER, B.J.; EWALT, D.R.; HALLING, S.M. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.*, v.11, n.3, p.1-13, 2003.

BRICKER, B.J.; EWALT, D.R. Evaluation of the HOOF-print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol.*, v.5, n.1, p.37, 2005.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.1-4, p.435-446, 2002.

BROWER, A.; OKWUMABUA, O.; MASSENGILL, C.; et al. Investigation of the spread of *Brucella canis* via the U.S. interstate dog trade. *Int. J. Infect. Dis.*, v.11, n.5, p.454-458, 2007.

BROWN, J.; BLUE, J.L.; WOOLEY, R.E.; DREESSEN, D.W. *Brucella canis* infectivity rates in stray and pet dog populations. *Am. J. Public Health*, v.66, n.9, p.889-891, 1976.

BYNDLOSS, M.X.; TSOLIS, R.M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.4, n.1, p.111-127, 2016.

CADMUS, S.I.B.; ADESOKAN, H.K.; AJALA, O.O.; et al. Seroprevalence of *Brucella abortus* and *B. canis* in household dogs in southwestern Nigeria: a preliminary report. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.82, n.1, p.56-57, 2011.

- CARMICHAEL, L.; SHIN, S.J. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, v.11, n.3, p.161-165, 1996.
- CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1990, p. 573-584.
- CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Brucellosis Canina. In: Carmichael, LE, Greene CE. Enfermedades infecciosas em perros y gatos. México, Interamericana: McGrawHill, 1993, p. 604-615.
- CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and the cat. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, p. 248-257.
- CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet.*, v.77, n.1, p.3-12, 1987.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.152, n.6, p.605-616, 1968.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.156, n.12, p.1726-1734, 1970.
- CARMICHAEL, L.E. Abortion in 200 beagles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.149, p.1126, 1966.
- CARMICHAEL, L.E. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR, eds. Animal Brucellosis. Boca Raton, FL: CRC Press; 1990, p. 335-350.
- CARMICHAEL, L.E. Brucelosis canina causada por *B. canis*: enfermedad clínica; problemas em inmunodiagnostico. *Rev. Med. Vet.*, v.80, p.102-106, 1998.
- CARVALHO, T.F.; HADDAD, J.P.A.; PAIXÃO, T.A.; et al. Meta-analysis and advancement of brucellosis vaccinology. *PloS One*, v.11, n.11, e0166582, 2016.
- CASTRILLÓN-SALAZAR, L.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.A.; SÁNCHEZ JIMÉNEZ, M.M.; et al. Factores asociados com la seropositividad a *Brucella canis* em criaderos caninos de dos regiones de Antioquia, Colombia. *Cad. Saúde Pública*, v.29, p.1975-1987, 2013.
- CASTRO, J.R.; SILVA, C.B.; SOUZA, M.A.; et al. Alterações hematológicas em cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp., *Brucella abortus* e *Brucella canis*. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.36, n.1, p.49-54, 2014.
- CAVALCANTI, L.A.; DASSO, M.G.; OLIVEIRA, F.C.S.; et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.7, n.2, p.176-180, 2006.
- CBRA, 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ed. Colégio Brasileiro de reprodução animal (CBRA), Belo Horizonte.

CELLI, J.; DE CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.M.; et al. *Brucella* evades macrophage killing via *VirB*-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, v.198, n.4, p.545-556, 2003.

Center for Food Security and Public Health. Canine Brucellosis: *Brucella canis* Contagious Abortion, Undulant Fever. Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, 2012.

CHACÓN-DÍAZ, C.; ALTAMIRANO-SILVA, P.; GONZÁLES-ESPINOZA, G.; et al. *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infect. Immun.*, v.83, n.12, p.4861-4870, 2015.

Chemistry (Cobas). Animal Health Diagnostic Center: Cornell University, <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/laboratories/clinicalpathology/reference-intervals/chemistry>; 2016 [Acessado em Outubro de 2018].

CHINYOKA, S.; DHLIWAYO, S.; MARABINI, L.; et al. Serological survey of *Brucella canis* in dogs in urban Harare and selected rural communities in Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.85, n.1, p.1-5, 2014.

CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; GHERSI, G.; et al. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine*, v.31, n.51, p.6129-6135, 2013.

CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; IBÁÑEZ, A.E.; et al. Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, n.12, p.1689-1694, 2014.

CLAUSSE, M.; DÍAZ, A.G.; PARDO, R.P.; et al. Polymeric antigen BLSOmp31 in aluminium hydroxide induces serum bactericidal and opsonic antibodies against *Brucella canis* in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.184, n.1, p.36-41, 2017.

CORBEL MJ. Brucellosis in Humans and Animals. 1st ed. WHO Press, World Health Organization: Switzerland; 2006.

CORTES, V.A.; OLIVEIRA, M.C.G.; ITO, F.H.; et al. Reações sorológicas para *Brucella canis* em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo - Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet.*, v.25, n.1, p.101-107, 1988.

COSFORD, K.L. *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *Can. Vet. J.*, v.59, n.1, p.74-81, 2018.

CURRIER, R.W.; RAITHEL, W.F.; MARTIN, R.J.; POTTER, M.E. Canine brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, n.2, p.132-133, 1982.

DAHLBOM, M.; JOHNSON, M.; MYLLYS, V.; et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Reprod. Domest. Anim.*, v.44, n.1, p.128-131, 2009.

- DAMP, S.C.; CRUMRINE, M.H.; LEWIS, G.E.; et al. Plate agglutination test for *Brucella canis* antibodies. *Appl. Microbiol.*, v.25, n.3, p.489-490, 1973.
- DENTINGER, C.M.; JACOB, K.; LEE, L.V.; et al. Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy, New York City, 2012. *Zoonoses Public Health*, v.62, n.5, p.407-414, 2015.
- DORNELES, E.M.S.; SANTOS, H.; MINHARRO, S.; et al. Anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães de Araguaína, Tocantins. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.48, n.2, p.167-171, 2011.
- DORNELES, E.M.S.; LIMA, G.K.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51. *Plos One*, v.10, n.9, e0136696, 2015.
- DREER, M.P.; GONÇALVES, D.; CAETANO, I.S.; et al. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.*, v.19, n.1, p.23, 2013.
- EBANI, V.V.; CERRI, D.; FRATINI, F.; et al. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiol.*, v.26, n.1, p.65-73, 2003.
- EDMONDS, M.D.; CLOECKAERT, A.; BOOTH, N.J.; et al. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, n.9, p.1461-1466, 2001.
- EGLOFF, S.; SCHNEEBERGER, M.; BRAWAND, S.G.; et al. *Brucella canis* infection in a young dog with epididymitis and orchitis. *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, v.160, n.12, p.743-48, 2018.
- EKERS, B.M. *Brucella* cultures typed by the who brucellosis centre at the common wealth serum laboratories, Melbourne. *Aust. Vet. J.*, v.54, n.9, p.440-443, 1978.
- ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos em el diagnostico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Arch. Med. Vet.*, v.31, n.1, p.5-17, 1999.
- ETSEBETH, C. A serological survey to determinate the prevalence of *Brucella canis* infection in dogs within the Nelson Mandela Bay Metroplitan in the Eastern Cape, South Africa. Tese, Universidade da África do Sul- Campus da Florida. 2017. Available from:http://uir.unisa.ac.za/bitstream/handle/10500/23286/dissertation_etsebeth_c.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- FERNANDES, A.R.D.F.; FERNANDES, A.G.; ROTONDANO, T.E.D.F.; et al. Inquérito sorológico e molecular da brucelose canina no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc. Rural*, v.43, n.9, p.1629-1635, 2013.
- FERNANDES, A.R.F.; AZEVEDO, S.S.; PIATTI, R.M.; et al. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.42, n.4, p.1405-1408, 2011.

- FERREIRA, T.; GOMES, M.J.P.; RONCONI, M.A. et al. Brucelose canina: ocorrência em um canil comercial. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.3, p.555-556, 2003.
- FLORES-CASTRO, R.; SEGURA, R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet.*, v.66, n.3, p.347-352, 1976.
- FLORES-CASTRO, R.; SUAREZ, F.; RAMIREZ-PFEIFFER, C.; et al. Canine brucellosis: bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. *J. Clin. Microbiol.*, v.6, n.6, p.591-597, 1977.
- FORBES, J.N.; FREDERICK, S.W.; SAVAGE, M.Y.; CROSS, A.R. *Brucella canis* sacroiliitis and discospondylitis in a dog. *Can. Vet. J.*, v.60, n.12, p.1301-1304, 2019.
- FREDRICKSON, L.E.; BARTON, C.E. A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.165, n.11, p.987-989, 1974.
- FROST, A. Feeding of raw *Brucella suis*-infected meat to dogs in the UK. *Vet. Rec.*, v.181, n.18, p.484, 2017.
- GARDNER, D.E.; REICHEL, M.P. No evidence of *Brucella canis* infection in New Zealand dogs. *Surveillance*, v.24, n.3, p.17-18, 1997.
- GEORGE, L.W.; CARMICHAEL, L.E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.35, n.7, p.905-909, 1974.
- GEORGE, L.W.; CARMICHAEL, L.E. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, n.20, p.274-281, 1984.
- GEORGE, L.W.; DUNCAN, J.R.; GEORGE, L.W. Semen examination in dogs with canine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, n.11, p.1589-1595, 1979.
- GODOY, A.M.; PERES, J.N.; BARG, L. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.29, n.1, p.35-42, 1977.
- GODOY, A.M.; NEVES, J.; PERES, J.N.; et al. Human laboratory infection with *Brucella canis*. *Arq. Escola Veterinária da UFMG*, v.31, n.2, p.141-145, 1979.
- GONZÁLES, H.B.; RAMÍREZ, R.M.P.; CASTRO, R.F.; GUEMES, F.S. Reproductive problems in male dogs infected with *Brucella canis*. *Vet. Méx.*, v.35, n.2, p.121-128, 2004.
- GOPAUL, K.K.; KOYLASS, M.S.; SMITH, C.J.; WHATMORE, A.M. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol.*, v.8, n.1, p.86, 2008.
- GOUS, T.A.; VAN RENSBURG, W.J.J.; GRAY, M.; et al. *Brucella canis* in South Africa. *Vet. Rec.*, v.157, n.21, p.668, 2005.
- GREENE, C.E.; CARMICHAEL, L.E. Canine brucellosis. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2012, p. 398-411.
- GYURANECZ, M.; SZEREDI, L.; RÓNAI, Z.; et al. Detection of *Brucella canis* induced reproductive disease in a kennel. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.23, n.1, p.143-147, 2011.

- HALL, W.H.; MANION, R.E. *In vitro* susceptibility of *Brucella* to various antibiotics. *Appl. Microbiol.*, v.20, n.4, p.600-604, 1970.
- HENDERSON, R.A.; HOERLEIN, B.F.; KRAMER, T.T.; MEYER, M.E. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.165, n.5, p.451-455, 1974.
- HENSEL, M.E.; NEGRON, M.; ARENAS-GAMBOA, A.M. Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerg. Infect. Dis.*, v.24, n.8, p.1401-1406, 2018.
- HERMAN, L.; RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.6, p.2099-2101, 1992.
- HIGGINS, J.L.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; BOWEN, R.A. Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1. *PLoS One*, v.12, n.10, e0185823, 2017.
- HIGGINS, J.L.; HOQUET, F.; BOURQUE, R.; GOSSELIN, Y. A serological survey for *Brucella canis* in dogs in the province of Quebec. *Can. Vet. J.*, v.20, n.11, p.315, 1979.
- HILBINK, F.; WRIGHT, M.; ROSS, G. Use of the double immuno gel diffusion test and the enzyme linked immunosorbent assay to distinguish false from true reactors in the complement fixation test for *Brucella ovis*. *N. Z. Vet. J.*, v.41, n.3, p.111-115, 1993.
- HINIC, V.; BRODARD, I.; PETRIDOU, E.; et al. Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1. *Vet. Microbiol.*, v.141, n.3-4, p.391-392, 2010.
- HINIC, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* and *B. neotomae* suitable for both conventional and real time PCR systems. *J. Microbiol. Methods*, v.75, n.2, p.375-378, 2008.
- HOFER, E.; BAG, Z.N.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; et al. First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. *New Microbiol.*, v.35, n.4, p.507-510, 2012.
- HOFF, G.L.; NICHOLS, J.B. Canine brucellosis in Florida: serologic survey of pound dogs, animal shelter workers and veterinarians. *Am. J. Epidemiol.*, v.100, n.1, p.35-39, 1974.
- HOLLETT, R.B. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, v.66, n.3, p.575-587, 2006.
- HOLST, B.S.; LÖFQVIST, K.; ERNHOLM, L.; et al. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Vet. Scand.*, v.54, n.18, p.1-9, 2012.
- HONG, J.Y.; PARK, J.S.; HAN, T.H.; HWANG, H. Investigation of *Brucella canis* infection in public animal shelters and kennels in Incheon. *Korean J. Vet. Serv.*, v.33, n.1, p.23-27, 2010.
- HONG, P.C.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect. Immun.*, v.68, n.7, p.4102-4107, 2000.

HOU, H.; LIU, X.; PENG, Q. The advances in brucellosis vaccines. *Vaccine*, v.37, n.30, p.3981-3988, 2019.

HUBBARD, K.; WANG, M.; SMITH, D.R. Seroprevalence of brucellosis in Mississippi shelter dogs. *Prev. Vet. Med.*, v.159, n.1, p.82-86, 2018.

JAVERI, H.; JAMIESON, S.; SEHGAL, R.; CADENA, J. *Brucella canis* peritonitis. *Infect.*, v.42, n.1, p.195-197, 2014.

JIANG, H.; MAO, L.L.; ZHAO, H.Y.; et al. Reemergence and genetic comparison of *Brucella canis* in China, using a multiple-locus variable-number tandem-repeat assay. *Vet. Microbiol.*, v.3, n.154, p.419-421, 2012.

JIMENEZ-DE-BAGUES, M.P.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; DORNAND, J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect. Immun.*, v.72, n.4, p.2429-2433, 2004.

JOHNSON, C.A.; BENNETT, M.; JENSEN, R.K.; SCHIRMER, R. Effect of combined antibiotic therapy on fertility in brood bitches infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, n.11, p.1330-1333, 1982.

JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.114, n.6, p.763-772, 1992.

JOHNSON, C.A.; CARTER, T.D.; DUNN, J.R.; et al. Investigation and characterization of *Brucella canis* infections in pet-quality dogs and associated human exposures during a 2007–2016 outbreak in Michigan. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.253, n.3, p.322-336, 2018.

JUNG, J.Y.; YOON, S.S.; LEE, S.H.; et al. Prevalence state of canine brucellosis in South Korea during 2015 and 2016. *Korean J. Vet. Res.*, v.58, n.3, p.125-129, 2018.

KADEN, R.; AGREN, J.; BAVERUD, V.; et al. Brucellosis outbreak in a Swedish kennel in 2013: Determination of genetic markers for source tracing. *Vet. Microbiol.*, v.174, n.3-4, p.523-30, 2014.

KAHL-MCDONAGH, M.M.; FICHT, T.A. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect. Immun.*, v.74, n.7, p.4048-4057, 2006.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. California: Elsevier; 2008.

KANG, S.I.; HER, M.; KIM, J.W.; et al. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.77, n.18, p.6726-6728, 2011.

KANG, S.I.; LEE, S.E.; KIM, J.Y.; et al. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.37, n.4, p.237-241, 2014.

- KATAMI, M.; SATO, H.; YOSHIMUR, Y.; et al. An epidemiological survey of *Brucella canis* infection of dogs in the Towada area of Aomori prefecture. *J. Vet. Med. Sci.*, v.53, n.6, p.1113-1115, 1991.
- KATTAR, M.M.; ZALLOUA, P.A.; ARAJ, G.F.; et al. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v.59, n.1, p.23-32, 2007.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; MORAIS, Z.M.; et al. *Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.35, n.1-2, p.161-166, 2004.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; et al. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*, v.67, n.7, p.1203-1210, 2007a.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; et al. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, v.68, n.9, p.1260-1270, 2007b.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VIEIRA, N.R.; et al. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Vet. Res. Commun.*, v.31, n.8, p.951-965, 2007c.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; et al. Comparison of agar-gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res. Vet. Sci.*, v.86, n.1, p.22-26, 2009.
- KEID, L.B.; DINIZ, J.A.; OLIVEIRA, T.M.; et al. Evaluation of an immunochromatographic test to the diagnosis of canine brucellosis caused by *Brucella canis*. *Reprod. Domest. Anim.*, v.50, n.6, p.939-944, 2015.
- KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; et al. Comparison of PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. *Vet. Rec.*, v.167, n.3, p.96-99, 2010.
- KEID, L.B.; CHIEBAO, D.P.; BATINGA, M.C.A.; et al. *Brucella canis* infection in dogs from commercial breeding kennels in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.*, v.64, n.3, p.691-697, 2017.
- KERWIN, S.C.; LEWIS, D.D.; HRIBERNIK, T.N.; et al. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.201, n.8, p.1253-1257, 1992.
- KIKUCHI, Y.K.; SAKUMA, Y.S.; SATO, T.; et al. A Survey of *Brucella canis* infection in dogs sheltered in Tohoku Univeristy School of Medicine. *Exp. Anim.*, v.28, n.2, 279-286, 1979.
- KIM, J.W.; LEE, Y.J.; HAN, M.Y.; et al. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. *J. Vet. Med. Sci.*, v.69, n.11, p.1103-1107, 2007.

- KIM, W.K.; MOON, J.Y.; CHO, J.S.; et al. *Brucella abortus* lysed cells using GI24 induce robust immune response and provide effective protection in Beagles. *Pathog. Dis.*, v.76, n.1, p.1-6, 2018.
- KIMURA, M.; IMAOKA, K.; SUZUKI, M.; et al. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. *J. Vet. Med. Sci.*, v.70, n.7, p.707-709, 2008.
- KO, J.; SPLITTER, G.A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, n.1, p. 65-78, 2003.
- KORNEGAY, J.N.; BARBER, D.L. Diskospondylitis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.177, n.4, p.337-341, 1980.
- KRUEGER, W.S.; LUCERO, N.E.; BROWER, A.; et al. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. *Zoonoses Public Health*, v.61, n.7, p.509-518, 2014.
- LALSIAMTHARA, J.; LEE, J.H. Development and trial of vaccines against *Brucella*. *J. Vet. Sci.*, v.18, n.51, p.281-290, 2017.
- LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J.P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.8, n.1, p.60-66, 2005.
- LARA-LARA, J.; ARGÁEZ-RODRÍGUEZ, F.; RODRÍGUEZ-BUENFIL, J.; et al. Brucelosis canina. Estudio serológico en perros de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Rev. Biomédica*, v.4, p.15-18, 1993.
- LARSSON, M.H.M.A.; LARSSON, C.E.; MIRANDOLA, R.M.S.; et al. Canine brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. *Int. J. Zoonoses*, v.8, n.1, p.85-90, 1981.
- LAWACZECK, E.; TOPOREK, J.; CWIKLA, J.; MATHISON, B.A. *Brucella canis* in a HIV-infected patient. *Zoonoses Public Health*, v.58, n.2, p.150-152, 2011.
- LE FLÈCHE, P.; JACQUES, I.; GRAYON, M.; et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, v.6, p.9, 2006.
- LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I.O.; LOPEZ-MERINO, A.; et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.12, p.3087-3090, 1995.
- LEDBETTER, E.C.; LANDRY, M.P.; STOKOL, T.; et al. *Brucella canis* endophthalmitis in 3 dogs: clinical features, diagnosis, and treatment. *Vet. Ophthalmol.*, v.12, n.3, p.183-191, 2009.
- LIMA, D.C. Estudo preliminar da ocorrência de anticorpos anti *Brucella canis* e *Brucella abortus* em cães de Sergipe. Monografia, 37 f. 2009. Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

- LIMA, A.C.T.; SOUZA, A.B.; SOUZA, F.A.L.; et al. Frequência de anticorpos anti - *Brucella canis* em cães de Teresina - PI. *Acta Vet. Bras.*, v.8, n.2, p.130-131, 2014.
- LÓPEZ, G.; AYALA, S.M.; EFRON, A.M.; et al. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. *Rev. Argent. Microbiol.*, v.41, n.2, p.97-101, 2009.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GUZMÁN-VERRI, C.; MANTEROLA, L.; et al. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.*, v.90, n.14, p.329-339, 2002.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.M.; et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-Ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, n.10, p.3484-3487, 2008.
- LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.M.; et al. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.*, v.54, n.1-2, p.152-155, 2011.
- LORD, V.R.; SCHURING, G.G.; CHERWONODRODZKY, J.W. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, n.8, p.1016-1020, 1998.
- LOVEJOY, G.S.; CARVER, H.D.; MOSELEY, I.K.; HICKS, M. Serosurvey of dogs for *Brucella canis* infection in Memphis, Tennessee. *Am. J. Public Health*, v.66, n.2, p.175-176, 1976.
- LUCERO, N.E.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M.; LOPEZ, G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J. Med. Microbiol.*, v.51, n.8, p.656-660, 2002.
- LUCERO, N.E.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M.; JACOB, N.R. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J. Med. Microbiol.*, v.54, n.1, p.457-461, 2005a.
- LUCERO, N.E.; JACOB, N.R.; AYALA, S.M.; et al. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. *J. Med. Microbiol.*, v.54, n.5, p.505-508, 2005b.
- LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; JACOB, N.R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.*, v.136, n.4, p.496-503, 2008.
- LUCERO, N.E.; CORAZZA, R.; ALMUZARA, M.N.; et al. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiol. Infect.*, v.138, n.2, p.280-285, 2010a.
- LUCERO, N.E.; MALDONADO, P.I.; KAUFMAN, S.; et al. *Brucella canis* causing infection in an HIV-infected patient. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.10, n.5, p.527-529, 2010b.
- LUNN, K.F. Fever of unknown origin: a systematic approach to diagnosis. *Compend. Contin. Educ. Vet.*, v.23, n.11, p.976-992, 2001.

- MACEDO, A.A.; SILVA, A.P.C.; MOL, J.P.S.; et al. The abcEDCBA-encoded ABC transporter and the *virB* operon-encoded type IV secretion system of *Brucella ovis* are critical for intracellular trafficking and survival in ovine monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, v.10, n.9, e0138131, 2015.
- MACHADO, M.A. Porcentagem de cães soropositivos para *Brucella canis* apresentando problemas reprodutivos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. *Ars Veterinária*, v.29, n.3, p.161-168, 2013.
- MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C.; DARINI, A.L.C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.64, n.2, p.155-161, 2005.
- MAKLOSKI, C.L. Canine brucellosis management. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.41, n.6, p.1209-1219, 2011.
- MANIAS, V.; NAGEL, A.; MOLLERACH, A.; et al. *Brucella canis* endocarditis: first documented case in Argentina. *Rev. Argentina Microbiol.*, v.45, n.1, p.50-53, 2013.
- MANTEROLA, L.; MORIYÓN, I.; MORENO, E.; et al. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J. Bacteriol.*, v.187, n.16, p.5631-5639, 2005.
- MAQUART, M.; LE FLECHE, P.; FOSTER, G.; et al. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.*, v.9, p.145, 2009.
- MARTÍN-MARTÍN, A.I.; CARO-HERNÁNDEZ, P.; ORDUÑA, A.; et al. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect.*, v.10, n.6, p.706-710, 2008.
- MARZETTI, S.; CARRANZA, C.; RONCALLO, M.; et al. Recent trends in human *Brucella canis* infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.36, n.1, p.55-61, 2013.
- MASCOLLI, R.; SOTO, F.R.M.; BERNARDI, F.; et al. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose e brucelose na população canina da Estância Turística de Ibiúna, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.83, p.1-7, 2016.
- MATEU-DE-ANTONIO, E.M.; MARTÍN, M.; SOLER, M. Used of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, n.7, p.1043-1046, 1993.
- MATEU-DE-ANTONIO, E.M.; MARTÍN, M.; CASAL, J. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.6, n.2, p.257-259, 1994.
- MATEU-DE-ANTONIO, E.M.; MARTÍN, M. *In vitro* efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Vet. Microbiol.*, v.45, n.1, p.1-10, 1995.

- MATHIAS, L.A.; ALBERTO, L.H.; ROXO, E.; et al. Avaliação de uma microtécnica de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da brucelose bovina e comparação entre os antígenos particulados e lipopolissacáride. *Ars Veterinária*, v.7, n.1, p.38-48, 1991.
- MATRONE, M.; KEID, L.B.; ROCHA, V.C.M.; et al. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Braz. J. Microbiol.*, v.40, n.3, p.480-489, 2009.
- McCUE, P.M.; O'FARREL, T.P.; Serological survey for selected diseases in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*). *J. Wild. Dis.*, v.24, n.2, p.274-281, 1988.
- MCKEE, M.A.; BALLARD, J.L. Mycotic aneurysms of the tibioperoneal arteries. *Ann. Vasc. Surg.*, v.13, n.2, p.188-190, 1999.
- MEDVECZKY, N.E.; CRICHTON, R. The application of a serological test to screen dogs entering Australia for antibody to *Brucella canis*. *Aust. Vet. J.*, v.63, n.11, p.375-377, 1986.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MORAES, C.C.G.; et al. Brucelose canina - relato de caso. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, n.4, p.103-106, 2002.
- MELO, S.M.B.; NASCIMENTO, R.M.; AGUIAR, P.H.P.; FREIRE, S.M.F. Avaliação sorológica em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães no distrito de Monte Gordo-Camaçari-Bahia. *Arqs. Esc. Med. Vet. UFBA*, v.19, n.1, p.119-127, 1997.
- MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
- MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; JUMAS-BILAK, E.; et al. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.*, v.179, n.10, p.3244-3249, 1997.
- MINHARRO, S.; COTTORRELO, A.C.P.; MIRANDA, K.L. et al. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.29, n.3-4, p.167-173, 2006.
- MOL, J.P.S.; FRANÇA, S.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.19, n.3, p.117-126, 2012.
- MOL, J.P.S.; GUEDES, A.C.B.; ECKSTEIN, C.; et al. Diagnosis of canine brucellosis: comparative study of different serological tests and PCR. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.32, n.1, p.77-86, 2020.
- MONROE, P.W.; SILBERG, S.L.; MORGAN, P.M.; ADESS, M. Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups. *J. Clin. Microbiol.*, v.2, n.5, p.382-386, 1975.
- MOORE, J.A.; GUPTA, B.N. Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.156, n.12, p.1737-1740, 1970.
- MOORE, J.A.; KAKUK, T.J. Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.155, n.8, p.1352-1358, 1969.

- MOR, S.M.; WIETHOELTER, A.K.; LEE, A.; et al. Emergence of *Brucella suis* in dogs in New South Wales, Australia: clinical findings and implications for zoonotic transmission. *BMC Vet. Res.*, v.12, n.199, p.1-9, 2016.
- MORAES, I.A.; VIEIRA, D.K.; OSSI, C.R.S.; et al. Identificação de cães reagentes à *Brucella canis* em ambientes rural e urbano no estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.7, p.123, 2000.
- MORAES, I. A.; LARANJA, H. F.; VIEIRA, D. K.; LOPES, S.; FREAZA; MELO, G.; PENCHEL, V. Identificação de cães potenciais transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. In: Anais XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador. Anais... Salvador: 2001.
- MORAES, C.C.G.; MEGID, J.; SOUZA, L.C. Prevalência da brucelose canina na microrregião da serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.69, n.2, p.7-10, 2002a.
- MORAES, I.A.; LARANJA, H.F.; VIEIRA, D.K.; et al. Identificação de cães potencialmente transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.9, n.3, p.154-157, 2002b.
- MORATA, P.; QUEIPO-ORTUNO, M.I.; DIOS COLMENERO, J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, n.9, p.2443-2446, 1998.
- MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.*, v.5, n.213, p.1-18, 2014.
- MORGAN, J.; PINTOS, V.; RYS, H.; et al. *Brucella canis* in a dog in the UK. *Vet. Rec.*, v.180, n.15, p.384, 2017.
- MORISSET, R.; SPINK, W.W. Epidemic canine brucellosis due to a new species, *Brucella canis*. *Lancet*, v.2, n.7628, p.1000-1002, 1969.
- MOSALLANEJAD, B.; NAJAFABADI, G.M.; AVIZEH, R.; MOHAMMADIAN, N. A serological survey on *Brucella canis* in companion dogs in Ahvaz. *Iranian J. Vet. Res.*, v.10, n.4, p.383-386, 2009.
- MUNFORD, R.S.; WEAVER, R.E.; PATTON, C.; et al. Human disease caused by *Brucella canis*. A clinical and epidemiologic study of two cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.231, n.12, p.1267-1269, 1975.
- MYERS, D.M.; JONES, L.M.; VARELA DIAZ, V.M. Studies of antigens for complement fixation and diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl. Microbiol.*, v.23, n.5, p.894-902, 1972.
- MYERS, D.M.; SINIUK, A.A. Preliminary report on the development of diffusion in gel method for the diagnosis of ram epididymitis. *Appl. Microbiol.*, v.19, n.2, p.335-337, 1970.
- MYERS, D.M.; VARELA-DÍAZ, V.M. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. *Cornell Vet.*, v.70, n.3, p.258-265, 1980.

NAVARRO, E.; CASAO, M.A.; SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, v.4, n.1, p.115-123, 2004.

NICOLETTI, P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.178, n.2, p.143-145, 1981.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.L.; HALBERT, G. *Salmonella enterica* serotype urbana interference with brucellosis serology. *J. Immunoassay Immunochem.*, v.28, n.3, p.289-296, 2007.

NOMURA, A.; IMAOKA, K.; IMANISHI, H.; et al. Human *Brucella canis* infections diagnosed by blood culture. *Emerg. Infect. Dis.*, v.16, n.7, p.1183-1185, 2010.

O'CALLAGHAN, D.; CAZEVIEILLE, C.; ALLARDET-SERVENT, A.; et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB* and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.*, v.33, n.6, p.1210-1220, 1999.

OLIVEIRA, M.Z.D. 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. 2008. Dissertação, 84 f. Universidade Federal da Bahia.

OLIVEIRA, M.Z.; VALE, V.; KEID, L.; et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res. Vet. Sci.*, v.90, n.3, p.425-431, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, E.F.; PINHEIRO, J.W.; SOUZA, M.M.; et al. Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in northeast Brazil. *J. Zoo. Wildl. Med.*, v.43, n.2, p.384-387, 2012.

ÖNCEL, T.; AKAN, M.; SAREYYÜPOĞLU, B.; et al. Seroprevalence of *Brucella canis* infection of dogs in two provinces in Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v.29, n.3, p.779-783, 2005.

PAIXÃO, T.A.; ROUX, C.M.; DEN HARTIGH, A.B.; et al. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect. Immun.*, v.77, n.10, p.41974208, 2009.

PALOMARES-RESENDIZ, E.; ARELLANO-REYNOSO, B.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; et al. Immunogenic response of *Brucella canis virB10* and *virB11* mutants in a murine model. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v.2, n.35, p.1-5, 2012.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M.; TSIANOS, E. Brucellosis. *N. Engl. J. Med.*, v.352, n.22, p.2325-2336, 2005.

PARDO, A.; PÉREZ, C.; GÓNGORA, A.; et al. Encuesta exploratoria de infección por *Brucella canis* en perros de Villavicencio-Colombia. *Rev. Mvz. Cordoba*, v.14, n.2, p.1690-1696, 2009.

- PATTEN, B.E. Antibodies to *B. canis* in dogs in Papua New Guinea. *Aust. Vet. J.*, v.64, n.11, p.355-355, 1987.
- PAZ, G.S.; ROCHA, K.S.; LIMA, M.S.; et al. Seroprevalence for brucellosis and leptospirosis in dogs from Belém and Castanhal, State of Pará, Brazil. *Acta Amaz.*, v.45, n.3, p.265-270, 2015.
- PEÑA, A.; ABARCA, K.; WEITZEL, T.; et al. One health in practice: a pilot project for integrated care of zoonotic infections in immunocompromised children and their pets in Chile. *Zoonoses Public Health*, v.63, n.5, p.403-409, 2016.
- PIAMPIANO, P.; MCLEARY, M.; YOUNG, L.W.; JANNER, D. Brucellosis: unusual presentations in two adolescent boys. *Pediatric Radiol.*, v.30, n.5, p.355-357, 2000.
- PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWE, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.8, p.151-156, 1989.
- POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; PAIXÃO, T.A.; et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, n.35, p.5327-5334, 2006.
- POESTER, F.P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L.E. Diagnosis of brucellosis. *Open Vet. Sci. J.*, v.4, p.46-60, 2010.
- POLLAK, C.N.; WANKE, M.M.; ESTEIN, S.M.; et al. Immunization with *Brucella* VirB proteins reduces organ colonization in mice through a Th1-type immune response and elicits a similar immune response in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, n.3, p.274281, 2015.
- POLT, S.S.; SCHAEFER, J. A microagglutination test for human *Brucella canis* antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.77, n.6, p.740-744, 1982.
- PORTO, W.J.N.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Associação entre distúrbios reprodutivos e anticorpos anti-*Brucella* sp. em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió-AL. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.15, n.1, p.6-9, 2008.
- QIAN, J.; BU, Z.; LANG, X.; et al. A safe and molecular-tagged *Brucella canis* ghosts confer protection against virulent challenge in mice. *Vet. Microbiol.*, v.204, n.1, p.121128, 2017.
- QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; GARCIA-ORDONEZ, M.A.; COLMENERO, J.D.; MORATA, P. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *Biotechniques*, v.27, n.2, p.248-250, 1999.
- QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; COLMENERO, J.D.; REGUERA, J.M.; et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.11, n.9, p.713-718, 2005.
- QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; COLMENERO, J.D.; BRAVO, M.; et al. Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.14, n.12, p.1128-1134, 2008.

- RANDHAWA, A.S.; KELLY, V.P.; BAKER JR, E.F. Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella* spp., with particular reference to *Brucella canis*, in wild animals of southern Texas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.171, n.9, p.939-942, 1977.
- REIS, C.B.; HOFFMANN, R.C.; SANTOS, R.S.; et al. Research of antibodies anti *Brucella canis* and anti-*Brucella abortus* in wandering dogs in São João da Boa Vista, State of São Paulo, Brazil (2002-2003). *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v.45, n.1, p.32-34, 2008.
- REYNES, E.; LÓPEZ, G.; AYALA, S.M.; et al. Monitoring infected dogs after a canine brucellosis outbreak. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.35, n.6, p.553-557, 2012.
- RHOADES, H.E.; MESFIN, G.M. *Brucella canis* infection in a kennel. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.75, n.4, p.595-599, 1980.
- RIFKIN, G.D.; SUPENA, R.B.; AXELSON, J.A. Case report. *Brucella canis* bacteremia: a case with negative *B. canis* agglutinins. *Am. J. Med. Sci.*, v.276, p.113115, 1978.
- ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GONI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.3, p.615-617, 1995.
- ROSINHA, G.M.S.; FREITAS, D.A.; MIYOSHI, A.; et al. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect. Immun.*, v.70, n.9, p.5036-5044, 2002.
- ROSSETTI, C.A.; DRAKE, K.L.; SIDDAVATAM, P.; et al. Systems Biology Analysis of *Brucella* Infected Peyer's Patch Reveals Rapid Invasion with Modest Transient Perturbations of the Host Transcriptome. *Plos One*, v.8, n.12, e81719, 2013.
- ROUSSEAU, P. *Brucella canis* infection in a woman with fever of unknown origin. *Postgrad. Med.*, v.78, n.5, p.249-257, 1985.
- SAEGUSA, J.; UEDA, K.; GOTO, Y.; FUJIWARA, K. A survey of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo area. *Nihon juigakuzasshi. Jpn. J. Vet. Sci.*, v.40, n.1, p.75-80, 1978.
- SAM, I.C.; KARUNAKARAN, R.; KAMARULZAMAN, A.; et al. A large exposure to *Brucella melitensis* in a diagnostic laboratory. *J. Hosp. Infec.*, v.80, n.4, p.321-325, 2012.
- SANDOVAL, L.A.; RIBEIRO, L.O.C.; AMARAL, L.B.S.; et al. Incidência da brucelose canina na cidade de São Paulo. *O Biológico*, v.42, n.32, p.126-132, 1976.
- SANTANA, J.A.; DORNELES, E.M.S.; DE SÁ JAYME, V.; et al. Risk factors and presence of antibodies to *Brucella canis* and smooth *Brucella* in dogs from the municipality of Araguaína, Tocantins, Brazil. *Semina: Cienc. Agrar.*, v.34, n.6, p.29512956, 2013.
- SAYAN, M.; ERDENLIG, S.; STACK, J.; et al. A serological diagnostic survey for *Brucella canis* infection in Turkish patients with brucellosis-like symptoms. *Jpn. J. Infect. Dis.*, v.64, n.6, p.516-519, 2011.
- SCHEFTEL, J. *Brucella canis*: potential for zoonotic transmission. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.25, n.11, p.846-853, 2003.

SCHOENEMANN, J.; LUTTICKEN, R.; SCHEIBNER, E. *Brucella canis* infection in man. *Deut. Med. Wochensch.*, v.111, n.1, p.20-22, 1986.

SCHOLZ, H.C.; PFEFFER, M.; WITTE, A.; et al. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multiprimer PCR that targets the *recA* gene. *J. Med. Microbiol.*, v.57, Pt.1, p. 64-71, 2008.

SCHURING, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccine: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, v.90, p.479-496, 2002.

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.41, n.6, p.607, 1979.

SEVERINO, P.; SILVA, C.F.; ANDRADE, L.N.; et al. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Pharm. Des.*, v.25, n.11, 1312-1334, 2019.

SILVA, A.P.C.; MACEDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet. Microbiol.*, v.167, n.3-4, p.546-553, 2013.

SILVA, A.P.C.; MACEDO, A.A.; SILVA, T.M.A.; et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated $\Delta abcBA$ Strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.22, n.7, p.789-797, 2015a.

SILVA, A.P.C.; MACEDO, A.A.; COSTA, L.F.; et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ($\Delta abcBA$) protects against wild type *Brucella ovis* in rams. *Plos One*, v.10, n.8, e0136865, 2015b.

SILVA, T.M.; MOL, J.P.; WINTER, M.G.; et al. The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. *PLoS One*, v.9, n.12, e114532, 2014.

SILVA, T.M.A.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; et al. Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect. Immun.*, v.79, n.4, p.1706-1717, 2011.

SILVA, C.P.A.; ALMEIDA, A.B.P.F.; GODOY, I.; et al. Detecção molecular de *Brucella canis* em cães do Município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Ciênc. Rural*, v.42, n.6, p.1051-1056, 2012a.

SILVA, L.C.; LEUZZI, L.Á.; NASSAR, J.L.B.; et al. Serological detection of *Brucella canis* in shelter dogs from Northern Paraná. *Semina: Cienc. Agrar.*, v.33, n.6, p.2391-2395, 2012b.

SIXL, W.; WISIDAGAMA, E.; STÜNZNER, D.; et al. Serological examinations of dogs (*Canis familiaris*) in Colombo/Sri Lanka. *Geog. Med. Suppl.*, v.1, p. 89-92, 1988.

SMEAK, D.D.; OLMSTEAD, M.L.; HOHN, R.B. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.191, n.8, p.986-990, 1987.

SOLA-LANDA, A.; PIZARRO-CERDÁ, J.; GRILLÓ, M.J.; et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in

- Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.29, n.1, p.125-138, 1998.
- SOUZA, L.A.; VIANA, R.C.A.; MICHALICK, M.S.M.; et al. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte–MG. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.24, n.3, p.127-131, 2002.
- SOUZA, T.D.; DE CARVALHO, T.F.; MOL, J.P.S.; et al. Tissue distribution and cell tropism of *Brucella canis* in naturally infected canine foetuses and neonates. *Sci. Rep.*, v.8, n.1, p.7203, 2018.
- STRANAHAN, L.W.; KHALAF, O.H.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; ARENAS-GAMBOA, A.M. Characterization of *Brucella canis* infection in mice. *Plos One*, v.14, n.6, e0218809, 2019.
- SWENSON, R.M.; CARMICHAEL, L.E.; CUNDY, K.R. Human infection with *Brucella canis*. *Ann. Intern. Med.*, v.76, n.3, p.435-438, 1972.
- TAKAYOSHI, T.A.H.; ISAYAMA, Y. Detection of *Brucella canis* infection in dogs in Hokkaido. *Microbiol. Immunol.*, v.21, n.5, p.295-298, 1977.
- TALUKDER, B.C.; SAMAD, M.A.; RAHMAN, A.K.M.A. Comparative evaluation of commercial serodiagnostic tests for the seroprevalence study of brucellosis in stray dogs in Bangladesh. *Bangladesh J. Vet. Med.*, v.9, n.1, p.79-83, 2011.
- TAM, R.; SAIER, M. H. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solutebinding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.*, v.57, n.2, p.320-346, 1993.
- TAYLOR, D.J. Serological evidence for the presence of *Brucella canis* infection in dogs in Britain. *Vet. Rec.*, v.106, n.5, p.102-104, 1980.
- TEIXEIRA, P.; VALLE, S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.
- THOMAS, W.B. Diskospondylitis and other vertebral infections. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.30, n.1, p.169-182, 2000.
- THYAGARAJAN, B.; DESHPANDE, S.S. Cotrimoxazole and neonatal kernicterus: a review. *Drug Chem. Toxicol.*, v.37, n.2, p.121-129, 2014.
- TOLARI, F.; FARINA, R.; ARISPICI, M.; et al. Brucellosis in the cat. Experimental infection with *Brucella canis*. *Annali Sclavo*, v.24, n.6, p.577-585, 1982.
- TOSI, M.F.; NELSON, T.J. *Brucella canis* infection in a 17-month-old child successfully treated with moxalactam. *J. Pediatr.*, v.101, n.5, p.725-727, 1982.
- TRAXLER, R.M.; LEHMAN, M.W.; BOSSERMAN, E.A.; et al. A literature review of laboratory-acquired brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* v.51, n.9, p.3055-3062, 2013.
- TRUONG, Q.L.; CHO, Y.; KIM, K.; et al. Booster vaccination with safe, modified, live-attenuated mutants of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine confers protective immunity against virulent strains of *B. abortus* and *Brucella canis* in BALB/c mice. *Microbiol.*, v.161, n.11, p.2137-2148, 2015.

- TSOLIS, R.M. Comparative genome analysis of the alpha-proteobacteria: relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.99, n.20, p.12503-12505, 2002.
- TSOLIS, R.M.; SESHADRI, R.; SANTOS, R.L.; et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *Plos One*, v.4, n.5, p.1-9, 2009.
- TUEMMERS, C.; LUDERS, C.; ROJAS, C.; et al. Detection of *Brucella canis* by immunochromatography method in vague dogs captured in Temuco city, Chile, 2011. *Rev. Chilena Infectol.*, v.30, n.4, p.395-401, 2013.
- ULU-KILIC, A.; KARAKAS, A.; ERDEM, H.; et al. Update on treatment options for spinal brucellosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.20, p.75-82, 2014.
- VAN DIJK, M.A.M.; ENGELSMA, M.Y.; VISSER, V.X.N.; et al. *Brucella suis* infection in dog fed raw meat, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, v.24, n.6, p.1127-1129, 2018.
- VASCONCELOS, R.T.J.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I.J.; et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Brucella canis* em cães da cidade de Campina Grande, estado da Paraíba. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.9, n.3, p.436-442, 2008.
- VIEIRA, D.K.; MORAES, I.A.; ROSSI, C.R.S.; RAMOS, M.L.M.; BARRETO, L.S. Identificação de cães reagentes à *Brucella canis* em ambientes rural e urbano no estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.7-supl., p.123, 2000.
- VITRY, M.A.; DE TREZ, C.; GORIELY, S.; et al. Crucial role of gamma interferonproducing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B Cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.*, v.80, n.12, p.4271-4280, 2012.
- VON KRUEDENER, R.B. Outbreak of a *Brucella canis* infection in a beagle colony in West Germany. *Dev. Biol. Stand.*, v.31, p.251-253, 1976.
- WALD, V.B.; FERNANDES, S.J.C. Sorologia da brucelose canina no Município de Porto Alegre, RS. *Arq. Fac. Vet. UFRS*, v.4, p.92-95, 1976.
- WALLACH, J.C.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; BALDI, P.C.; FOSSATI, C.A. Human Infection with M-strain of *Brucella canis*. *Emerg. Infect. Dis.*, v.10, n.1, p.146-148, 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. *J. Clin. Microbiol.*, v.88, n.4, p.367-375, 2002.
- WANKE, M.M. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, n.1, p.195-207, 2004.
- WANKE, M.; CAIRÓ, F.; ROSSANO, M.; et al. Preliminary study of an immunochromatography test for serological diagnosis of canine brucellosis. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, n.6, p.370-372, 2012.

- WARETH, G.; MELZER, F.; EL-DIASTY, M.; et al. Isolation of *Brucella abortus* from a dog and a cat confirms their biological role in re-emergence and dissemination of bovine brucellosis on dairy farms. *Transbound. Emerg. Dis.*, v.64, n.5, p.27-30, 2017.
- WEBER, A.; SCHLIESSER, T. The occurrence of antibodies to *Brucella canis* in domestic dogs in the Federal Republic of Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, v.91, n.2, p.28-30, 1978.
- WINCHELL, J.M.; WOLFF, B.J.; TILLER, R.; et al. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.3, p.697-702, 2010.
- WORTHINGTON, R.W.; STEVENSON, B.J.; LISLE, G.W. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N. Z. Vet. J.*, v.33, n.6, p.84-86, 1985.
- WINTERMANTEL, A. Seroepidemiological investigations of *Brucella canis* infection in dogs and human beings in southern Germany. Tese. Ludwig-Maximilians Universität, München. 1980. 67p.
- XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. *Ciênc. Rural.*, v.39, n.7, p.2252-2260, 2009.
- XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; et al. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.*, v.145, p.158-164, 2010.
- YING, W.; NGUYEN, M.Q.; JAHRE, J.A. *Brucella canis* endocarditis: case report. *Clin. Infect. Dis.*, v.29, n.6, p.1593-1594, 1999.
- YOUNG, E.J. An overview of human brucellosis. *Clin. Infect. Dis.*, v.21, n.2, p.283-290, 1995.
- ZAMORA, J.; ALONSO, O.; MARTIN, R. Brucelosis canina en Valdivia, Chile Estudio serológico y bacteriológico en perros de ciudad. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, v.27, n.2, p.149-153, 1980.
- ZOHA, S.J.; WALSH, R. Effect of a two-stage antibiotic treatment regimen on dogs naturally infected with *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.180, p.1474-1475, 1982.
- ZOLZAYA, B.; SELENGE, T.; NARANGARAV, T.; et al. Representative seroprevalences of human and livestock brucellosis in two Mongolian provinces. *EcoHealth*, v.11, n.3, p.356-371, 2014.

5. ANEXOS

Anexo 1

PLOS ONE

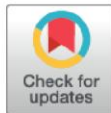
RESEARCH ARTICLE

Brucella ovis mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs

Camila Eckstein¹, Juliana P. S. Mol¹, Fabiola B. Costa¹, Philippe P. Nunes¹, Pâmela A. Lima¹, Marília M. Melo¹, Thaynara P. Carvalho¹, Daniel O. Santos¹, Monique F. Silva², Tatiane F. Carvalho¹, Luciana F. Costa¹, Otoni A. O. Melo Júnior³, Rodolfo C. Giunchette³, Tatiane A. Paixão², Renato L. Santos^{1*}

1 Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* rsantos@vet.ufmg.br



OPEN ACCESS

Citation: Eckstein C, Mol JPS, Costa FB, Nunes PP, Lima PA, Melo MM, et al. (2020) *Brucella ovis* mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. PLoS ONE 15(4): e0231893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231893>

Editor: Roy Martin Roop, II, East Carolina University Brody School of Medicine, UNITED STATES

Received: February 22, 2020

Accepted: April 2, 2020

Published: April 16, 2020

Copyright: © 2020 Eckstein et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Work in RLS lab is supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) grant CVZ - APQ-01591-14.

Abstract

Background/Objectives

Vaccination is the most important tool for controlling brucellosis, but currently there is no vaccine available for canine brucellosis, which is a zoonotic disease of worldwide distribution caused by *Brucella canis*. This study aimed to evaluate protection and immune response induced by *Brucella ovis* $\Delta abcBA$ ($Bo\Delta abcBA$) encapsulated with alginate against the challenge with *Brucella canis* in mice and to assess the safety of this strain for dogs.

Methods

Intracellular growth of the vaccine strain $Bo\Delta abcBA$ was assessed in canine and ovine macrophages. Protection induced by $Bo\Delta abcBA$ against virulent *Brucella canis* was evaluated in the mouse model. Safety of the vaccine strain $Bo\Delta abcBA$ was assessed in experimentally inoculated dogs.

Results

Wild type *B. ovis* and *B. canis* had similar internalization and intracellular multiplication profiles in both canine and ovine macrophages. The $Bo\Delta abcBA$ strain had an attenuated phenotype in both canine and ovine macrophages. Immunization of BALB/c mice with alginate-encapsulated $Bo\Delta abcBA$ (10^9 CFU) induced lymphocyte proliferation, production of IL-10 and IFN- γ , and protected against experimental challenge with *B. canis*. Dogs immunized with alginate-encapsulated $Bo\Delta abcBA$ (10^9 CFU) seroconverted, and had no hematologic, biochemical or clinical changes. Furthermore, $Bo\Delta abcBA$ was not detected by isolation or PCR performed using blood, semen, urine samples or vaginal swabs at any time point over the course of this study. $Bo\Delta abcBA$ was isolated from lymph nodes near to the site of inoculation in two dogs at 22 weeks post immunization.

Anexo 2**RESUMO****“COMPOSIÇÃO VACINAL PARA PREVENÇÃO DE BRUCELOSE
CANINA E USO”**

Certificado de Adição de Invenção do PI 1105977-0, depositado em 22/12/2011. A presente tecnologia trata de uma composição vacinal para prevenção de brucelose canina que compreende uma cepa de *Brucella ovis* mutante, viva, atenuada e deficiente de um gene que codifica proteínas de um ABC transportador específico, denominada $\Delta abcBA$, preferencialmente aliada a um mecanismo de liberação dessa cepa no hospedeiro de forma gradativa e contínua, como a encapsulação em alginato. A tecnologia trata também do uso da composição vacinal na preparação de medicamentos para prevenção de infecção por *Brucella canis*.

Tabela Suplementar 1. Levantamentos epidemiológicos da frequência de brucelose canina em cães no mundo.

País *	Referência	Frequência (%)	Freq. Absoluta	Método de diagnóstico
África do Sul	Etsebeth (2017)	9,75%	39/400	Aglutinação em tubo
Alemanha	Weber e Schliesser (1978)	0,2%	2/1000	Aglutinação em tubo
Alemanha	Von Kruedener (1976)	50,0%	100/200	Clínico
Alemanha	Wintermantel (1980)	0,6%	5/830	TAT
Argentina	López et al. (2009)	14,70%	33/224	RSAT
Argentina	Myers e Varela-Díaz (1980)	30,50%	40/131	Aglutinação em tubo
Argentina	Boeri et al. (2008)	7,30%	16/219	IDGA
Austrália	Medveczky e Crichton, (1986)	5,50%	18/325	RSAT
Austria	Hofer et al. (2012)	NA*	NA	SAT /Isolamento
Bangladesh	Talukder et al. (2011)	13,33%	4/30	RBPT
Canadá	Bosu e Prescott. (1980)	0,30%	100/2000	RSAT/ Aglutinação em tubo/ IDGA
Canadá	Higgins et al. (1979)	1,60%	6/341	RSAT
Chile	Abarca et al. (2011)	2,43%	1/41	ELISA
Chile	Tuermers et al. (2013)	1,00%	4/400	Imunocromatografia
Chile	Zamora et al., (1980)	21,84%	38/174	ALT
Chile	Peña et al., (2016)	14,28%	5/35	Aglutinação
China	Jiang et al. (2011)	48,75	39/80	RSAT
Colômbia	Castrillón-Salazar et al. (2013)	14,90%	64/428	RSAT
Colômbia	Aguelo-Flores et al. (2012)	2,76%	441	Imunocromatografia
Colômbia	Pardo et al., (2009)	1,98%	2/101	Não identificado
Colômbia	Pardo et al., (2009)	1,49%	3/201	Aglutinação
Coreia do Sul	Hong et al., (2009)	3%	10/402	Imunocromatografia
Coreia do Sul	Jung et al. (2018)	1%	30/2394	Imunocromatografia
Espanha	Mateu-de Antonio et al. (1994)	20,20%	70/346	RSAT

Estados Unidos	Lovejoy et al. (1976)	9,40%	22/235	Sorologia
Estados Unidos	Brower et al. (2007)	1,96%/4,60%	10/510; 8/174	Sorologia e eletroforese de campo pulsante
Estados Unidos	Brown et al. (1976)	0,50%	10/200	RSAT
Estados Unidos	Boebel et al., (1979)	6,70%	173/2572	Aglutinação em tubo
Estados Unidos	Hoff et al. (1974)	3,65%	10/274	RSAT
Finlândia	Dahlbon et al. (2009)	0	0/388	Aglutinação em tubo
Guiné	Patten (1987)	0,40%	1/225	Não informado
Índia	Barkha et al. (2011)	2,27%	12/527	Aglutinação em tubo
Irã	Mosallanejad et al. (2009)	4,90%	5/102	Imunocromatografia
Irã	Behzadi e Mogheiseh (2012)	10,62%	12/113	Imunocromatografia
Irã	Akhtardanesh et al. (2011)	15,8%/ 29,7%/12,6%	95	IFA/ RBT/ RSAT
Irã	Bigdeli et al. (2011)	21,90%	51/175	RSAT
Itália	Ebani et al. (2003)	1,07%	25/2328	RBT/AGID
Japão	Saegusa et al. (1978)	2,90%	27/945	Aglutinação
Japão	Takayoshi et al. (1977)	0,92%	5/540	Aglutinação
Japão	Katami et al. (1991)	1,90%	5/259	Aglutinação
Japão	Kikuchi et al. (1979)	11,20%	173/1549	RSAT
Japão	Kimura et al. (2008)	2,50%	12/485	MAT
México	Flores-Castro e Segura (1976)	28,00%	140/500	RSAT
México	Lara-Lara et al. (1993)	0,50%	1/200	Aglutinação
México	González et al. (2004)	42,80%	24/56	RSAT
Mongólia	Zolzaya et al. (2004)	36,40%	72	RBT
Nigéria	Adesiyun et al. (1986)	28,60%	64/224	SAT
Nigéria	Cadmus et al. (2011)	0,27%	1/366	RBPT
Nova Zelândia	Gardner e Reichel (2007)	0	0/90	SAT

Reino Unido	Taylor (1980)	28,40%	48/169	RSAT
Sri Lanca	Sixl et al. (1988)	10%	3/30	Aglutinação
Suécia	Kaden et al. (2014)	12%	3/25	qPCR
Suíça	Egloff et al. (2018)	NA	NA	Imunocromatografia/isolamento
Turquia	Aras e Uçan (2010)	8,30%	4/48	Isolamento/DNA
Turquia	Onçel et al. (2005)	12,70%	46/362	Aglutinação em tubo
Zimbábue	Chinyoka et al. (2014)	17,60%	57/324	ELISA

*NA: Não se aplica (relatos de caso sem levantamento epidemiológico).

Tabela Suplementar 2. Valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos em cães adultos

Parâmetros	Unidade	Valor	
Hematológicos	Leucócitos	$\times 10^3/\mu\text{L}$	6,0-17,0
	Eritrócitos	$\times 10^6/\mu\text{L}$	5,4-7,8
	Hematócrito	%	37-54
	Plaquetas	$\times 10^5/\mu\text{L}$	1,6-4,3
Bioquímicos	ALT	U/L U/L	17-95
	AST	mg/dL	18-56
	Bilirrubina total	U/L	0-0,2
	Fosfatase alcalina		7-115
	Ureia	mg/dL	20-56
	Creatinina	mg/dL	0,6-1,5
	Alfa amilase	U/L	322-1310

Os parâmetros hematológicos foram considerados de acordo com o descrito por Meyer e Harvey, 2004. Os valores de referência para parâmetros bioquímicos foram descritos pelo Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell (AHDC, 2014), exceto para os valores de ureia e creatinina que foram baseados nos valores citados por Kaneko et al. (1997).

Tabela Suplementar 3. Contagem diferencial de linfócitos, células segmentadas e eosinófilos em cães imunizados com *B. ovis* $\Delta abcBA$ encapsulada com alginato (Imunizado) ou inoculado com cápsulas estéreis de alginato (Controle).

Amostragem	Grupo	Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	Células segmentadas ($10^3/\mu\text{L}$)	Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)
-2si	Controle	2,50 \pm 0,9	7,36 \pm 2,34	0,46 \pm 0,05
	Imunizado	2,02 \pm 0,68	6,20 \pm 1,26	0,76 \pm 0,35
Imunização	Controle	2,16 \pm 0,51	6,28 \pm 2,21	0,64 \pm 0,24
	Imunizado	1,82 \pm 0,23	5,06 \pm 1,98	0,56 \pm 0,08
2 spi	Controle	2,50 \pm 0,37	5,68 \pm 3,70	0,64 \pm 0,13
	Imunizado	2,3 \pm 0,49	8,00 \pm 1,10	0,58 \pm 0,08
4 spi	Controle	2,72 \pm 0,64	7,30 \pm 1,99	0,82 \pm 0,27
	Imunizado	2,06 \pm 0,73	7,14 \pm 0,51	0,74 \pm 0,32
6 spi	Controle	2,90 \pm 0,84	9,12 \pm 1,33	0,78 \pm 0,30
	Imunizado	1,96 \pm 0,49	7,00 \pm 1,00	0,42 \pm 0,08
8 spi	Controle	1,94 \pm 0,59	6,16 \pm 1,51	0,56 \pm 0,21
	Imunizado	1,50 \pm 0,43	6,30 \pm 1,63	0,42 \pm 0,20
10 spi	Controle	1,90 \pm 0,56	6,92 \pm 2,04	0,50 \pm 0,18
	Imunizado	1,40 \pm 0,29	5,90 \pm 0,55	0,40 \pm 0,15
12 spi	Controle	3,20 \pm 0,66	7,88 \pm 1,60	0,90 \pm 0,41
	Imunizado	1,62 \pm 0,40	5,44 \pm 0,58	0,96 \pm 0,82
Valores de Referência*		1,0-4,8	3,0-11,5	0,1-1,25

*Valores de Referência de acordo com Meyer e Harvey (2004).