



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



MARCOS BORGES RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DE SOROS
CANINOS A DOIS EXTRATOS SOLÚVEIS DE
*BRUCELLA CANIS***

Salvador – Bahia
2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



MARCOS BORGES RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE DE SOROS
CANINOS A DOIS EXTRATOS SOLÚVEIS DE
*BRUCELLA CANIS***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Professora Orientadora: Songeli Menezes Freire

Co-orientador: Prof. Roberto Meyer

Salvador – Bahia
2003

Ficha Catalográfica elaborada pela

Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA – Salvador – Bahia

R484 Ribeiro, Marcos Borges,
Avaliação da imunoreatividade de soros caninos a dois extratos solúveis
de *Brucella canis* / Marcos Borges Ribeiro. - Salvador, 2003.
66 f. ; il.

Orientadora: Profa. Dra. Songeli Menezes Freire.
Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2003.

1. *Brucella canis*. 2. Brucelose. 3. Immunoblotting. 4. Western Blotting.
5. ELISA. 6. Sorologia. 7. Cães - Imunologia. I. Freire, Songeli Menezes.
II. Nascimento, Roberto José Meyer. III. Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 579.84



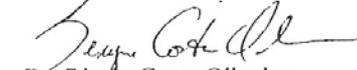
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

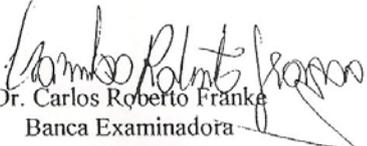


ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNO – MARCOS BORGES RIBEIRO

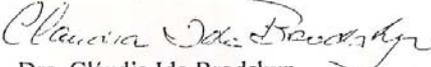
Aos vinte e dois dias do mês de dezembro do ano de dois mil e três, às 14:00 horas, no auditório III no segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Songeli Menezes Freire, Orientadora, Dr. Sérgio Costa Oliveira, Dr. Carlos Roberto Franke, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar a Dissertação intitulada “**Avaliação da imunorreatividade de soros caninos a dois extratos solúveis da *Brucella canis***”, do Mestrando, MARCOS BORGES RIBEIRO. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação de Mestrado APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 22 de dezembro de 2003.


 Dra. Songeli Menezes Freire
 Orientadora


 Dr. Sérgio Costa Oliveira
 Banca Examinadora


 Dr. Carlos Roberto Franke
 Banca Examinadora


 Marcos Borges Ribeiro
 Mestrando


 Dra. Cláudia Ida Brodskyn
 Coordenadora do PPGIm

AGRADECIMENTOS

- Dr^a Songeli Menezes Freire
- Prof. Roberto Meyer
- Prof^a Ivana Nascimento
- Dr^a Denise Lemmaire
- Prof. Robert Schaer
- Zoraida Daltro
- Prof^a Tereza Martinez
- Prof^a Lílian Costa
- Dr. Bruno Paule
- Ferdando Poester
- Sergio Ribeiro
- Mônica Franco
- Vera Vale
- Lia Fernandes
- Soraya Trindade
- Márcia Brandão
- Maria Olímpia
- Milena Salomão
- Marcondes Oliveira
- Renato Carminati
- Robson Bahia
- Funcionários do Labimuno
- Darci e Dilcea
- Serviço de Imunologia – HUPES-UFBA
- Centro de Controle de Zoonoses – Prefeitura de São Paulo
- Laboratório LIMC- CPqGM/FIOCRUZ-Salvador
- Fundação estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO/RS
- Laboratório de bacterioses – Hospital Veterinário – UFBA
- Laboratório de Doenças Parasitárias – Hospital Veterinário – UFBA

***Dedico este trabalho à “família” LABIMUNO,
pois a eles devo minha formação acadêmica***

Ribeiro, Marcos Borges. Avaliação da imunoreatividade de soros caninos a dois extratos solúveis de *Brucella canis*. 66 f. il. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

RESUMO

A brucelose canina é uma infecção bacteriana contagiosa, zoonótica, causada pela *Brucella canis*, responsável por aborto e *infertilidade*. A brucelose é uma doença de importância mundial pelo prejuízo ocasionado tanto para a saúde pública como para a economia nacional. O diagnóstico baseia-se principalmente na sorologia devido a inespecificidade dos sinais clínicos. Vários métodos têm sido descritos e utilizados para diagnóstico, porém a maioria comercialmente disponível produz resultados falsos positivos. Neste trabalho foi comparado o perfil de reconhecimento de Ig G sérica a dois extratos solúveis de *Brucella canis*, preparados de diferentes formas. Os soros foram analisados por ELISA Indireto com os dois extratos solúveis obtidos por calor e Ultra-som. Foram testadas 765 amostras de soros de cães domiciliados da cidade de Salvador e área metropolitana com sorologia desconhecida, 92 amostras de soros testadas no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo (CCZ-SP) pelo método IDGA com antígeno de *Brucella ovis* sendo 45 positivas e 47 amostras negativas. Para o cálculo do valor de corte foram utilizadas 21 amostras de soros de filhotes de cães saudáveis provenientes do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalves Muniz (CPqGM-Fiocruz) – Salvador –Ba. O perfil eletroforetico foi analisado por SDS-PAGE em sistema desnaturante e a reatividade dos antígenos solúveis foi avaliada pelo ELISA e Western Blotting, comparando diferentes grupos de soros. A comparação entre os ELISAs com ambos antígenos foi feito com todos os 857 soros. O ELISA com extrato solúvel obtido por calor indicou uma positividade de 10% (n=79) com valor de D.O de limite de corte de 0,235, já o ELISA com extrato solúvel obtido por ultra-som indicou uma positividade de 24% (n=187) com valor de D.O de limite de corte de 0,350. A análise estatística de correlação dos resultados encontrados nos estudos dos dois antígenos obtido por calor e ultra-som foi de 0,68. Os 92 soros do CCZ-SP testados pela IDGA foram utilizados para avaliar a especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo e eficiência dos ELISAs, sendo 51%,94%, 89%, 67% e 73% para o ELISA com extrato obtido por calor e de 69%, 83%, 80%,74% e 76% para o ELISA com o extrato obtido por ultra-som, respectivamente. A concordância entre os ELISAs utilizando os dois extratos solúveis dada pelo índice Kappa foi de $\kappa= 0,38$. O Elisa realizado com extrato solúvel obtido por calor mostrou concordância com a IDGA de $\kappa=0,45$ e o ELISA utilizando extrato solúvel obtido por ultra-som e a IDGA com $\kappa= 0,52$. A imunoreatividade do extrato antigênico solúvel de *B. canis* obtido por calor (extrato aquecido), utilizando soros de animais positivos na IDGA e ELISA, apresentou com maior frequência as bandas 65 KDa, 58 KDa, 56 KDa, 18 KDa e 12 KDa e o extrato obtido por ultra-som as bandas 68 KDa, 52 KDa, 46 KDa, 38 KDa, 28 KDa, 18 KDa. Os antígenos utilizados para os ELISAs aquecido e sonicado, mostram diferentes perfis eletroforético em análise pela técnica SDS-PAGE, sugerindo diferentes composições protéicas. Os extratos analisados por

ELISA, apesar de apresentarem bons valores de controle de qualidade, sendo o de ultra-som melhor que os aquecidos, necessitam ser avaliados quanto a sua reatividade com soros de animais com diagnóstico de brucelose canina confirmados por isolamento bacteriano ou por PCR.

Ribeiro, Marcos Borges. Evaluation of immunoreactivity of canine sera the two soluble extracts of *Brucella canis*. 66 pp. ill. 2003. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

ABSTRACT

Canine Brucellosis is a zoonotic infectious bacterial disease caused by *B. canis*, which may cause infertility and abortion. Brucellosis is an important worldwide disease affecting both public health and national economies. The diagnosis is based mainly in serological tests due to the inespecificity of clinical symptoms. Several diagnostically been studied and are used, but most commercially available tests present false-negative results in this work profiles of serological IgG recognition of two different soluble extracts of *B. canis* were studied. The sera were analyzed by indirect Elisa using antigenic extracts obtained by heat extraction and sonication. A total of 765 samples from the metropolitan area of Salvador-BA (previously untested), 92 samples (45 positives and 47 negatives) from the Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-SP) previously tested by IDGA method using *B. ovis* antigen. For the determination of cut-off values 21 samples from puppies from healthy parents raised in the biotery of the Centro de Pesquisas Gonçalo-Muniz (CPQGM-FIOCRUZ) Salvador-BA were used. The eletrophoretical profile was analyzed by denaturant SDS-PAGE and the antigenic reactivity of soluble antigens evaluated using Elisa and Western Blotting, comparing different sera groups. Elisa tests using both antigenic preparations were performed in all 857 sera. Elisa using the soluble extract obtained by heat extraction showed a positivity rate of 10% (n=79) with a D.O. cut-off value of 0,235. When the sonicated extract was used the Elise presented a positivity rate of 24% (n=187) with a D.O. cut-off value of 0,350. The statistical analysis of the correlations of the results using the two antigenic preparations was 0,68. The 92 sera from CCZ-SP tested by IDGA were used to evaluate the specificity, sensitivity, predictive positive and negative values and the efficacy of the Elisa tests. The results showed 51%, 94%, 89%, 67% and 73% for the heat extraction antigens and 69%, 83%, 80%, 74% and 76% for the sonicated antigens. The agreement index of the Elisa tests using the two soluble extracts showed a Kappa index of K=0,38. Elisa performed with the heat extraction antigens showed the agreement index with the IDGA of K=0,45 and the Elisa using the sonicated preparation showed the agreement index with the IDGA of K=0,52. The Immunoreactivity of the soluble antigens obtained through heat extraction tested with sera from animals positive in both Elisa and IDGA tests presented a high frequency of the 65, 58, 56, 18 and 12 Kda proteic bands and the sonicated extracts showed proteic bands of 68, 52, 46, 38, 28 and 18 Kda. The heat extraction and sonicated antigens used for the Elisa tests showed different eletrophoretical profiles by analysis with SDS-PAGE, suggesting different proteic compositions. The extracts analyzed using Elisa tests although presenting good quality control values, the sonicated showing better results, still need to be evaluated for their reativity using sera with *B. canis* infected animals, can firmed by the isolation of the bacteria and by PCR tests.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS	15
2.2. ASPECTOS CLÍNICOS	19
2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA BRUCELOSE CANINA	21
3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA	26
4. OBJETIVOS:	27
4.1. GERAL	27
4.2. ESPECÍFICO	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. AMOSTRAS DE SOROS	28
5.2. CULTURAS DE <i>Brucella Canis</i>	28
5.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE <i>Brucella Canis</i>	29
5.3.1- Extrato solúvel obtido por Ultra-som	29
5.3.2- Extrato solúvel obtido por calor	30
5.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA INDIRETO)	30
5.4.1 Cálculo do valor de corte	31
5.4.2 Cálculo da D.O. corrigida (DOC)	31
5.4.3. Cálculos estatísticos e de concordância entre antígenos	32
5.4.4. Cálculo da especificidade, sensibilidade, valores preditivos e eficiência	32
5.5 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	33
5.6 WESTERN BLOTTING	33
6. RESULTADOS	35
6.1. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO UTILIZANDO EXTRATO SOLÚVEL OBTIDO POR CALOR (ELISA INDIRETO EXTRATO AQUECIDO)	35
6.1.1. Soros de cães domiciliados	35
6.1.2. Soros de cães testados pelo CCZ-SP por IDGA	35

6.2. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO UTILIZANDO Extrato ANTIGÊNICO OBTIDO POR ULTRA-SOM (ELISA indireto sonicado).	36
6.2.1. Soros de cães domiciliados	36
6.2.2. Soros de cães testados pelo CCZ-SP por IDGA	36
6.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONCORDÂNCIA ENTRE REATIVIDADE ANTIGÊNICA	39
6.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING	41
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÕES	50
PERSPECTIVAS FUTURAS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
PUBLICAÇÃO	59

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) corado pelo Coomassie blue R250 com extrato solúvel de *B. canis* obtidos por ultra-som (a), calor (b) e (c) padrão de baixo peso molecular (LMW- Pharmacia).42
- Figura 2.** Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por calor em membranas de nitrocelulose com soros positivos na IDGA e ELISA Indireto.42
- Figura 3.** Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por calor em membrana de nitrocelulose com soros negativos na IDGA , ELISA Indireto com antígeno obtido por calor e positivos ELISA Indireto com antígeno obtido por Ultra-som.43
- Figura 4.** Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por calor em membrana de nitrocelulose com soros negativos na IDGA e ELISA Indireto.43
- Figura 5.** Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por ultra-som em membrana de nitrocelulose com soros positivos na IDGA e ELISA Indireto.44
- Figura 6.** Immonoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por ultra-som em membrana de nitrocelulose com soros negativos na IDGA e positivos no ELISA Indireto.44

ÍNDICE DE TABELAS e GRÁFICOS

Tabela 1.	Resultado da reatividade dos soros de cães domiciliados de Salvador e área Metropolitana analisados pelo ELISA Indireto com extrato solúvel de <i>Brucella canis</i> obtido pelo calor e ultra-som.	37
Tabela 2.	ELISA Indireto com extrato antigênico de <i>Brucella canis</i> obtido pelo calor e ultra-som.....	37
Tabela 3.	Comparação da reatividade dos soros de cães (CCZ-SP) analisados por IDGA (Tecpar-Brasil) e ELISA Indireto com extrato antigênico de <i>Brucella canis</i> obtido pelo calor.....	37
Tabela 4.	Comparação da reatividade dos soros de cães (CCZ-SP) analisados por IDGA (tecpar-brasil) e ELISA Indireto com extrato antigênico de <i>Brucella canis</i> obtido pelo ultra-som.....	37
Tabela 5.	Análise dos ELISAs com antígenos obtidos de <i>B. canis</i> por calor e ultra-som.	40
Tabela 5.	Análise da concordância (Kappa) dos testes de reatividade a <i>Brucella canis</i> com as amostras de soros de cães.	40
Gráfico 1-	Distribuição da freqüência dos 765 soros de cães domiciliados em Salvador e Área Metropolitana no ELISA Indireto com extrato solúvel aquecido de <i>B. canis</i>	38
Gráfico 2-	Distribuição da freqüência dos 765 soros de cães domiciliados em Salvador e Área Metropolitana no ELISA Indireto com extrato solúvel sonicado de <i>B. canis</i>	38
Gráfico 3-	Correlação entre reatividade dos soros caninos domiciliados analisados pelos ELISAs Aquecido e Sonicado.	40

1. INTRODUÇÃO

No contexto de saúde pública, o cão foi por muito tempo negligenciado como fonte de infecção de brucelose para o homem devido à sua relativa resistência natural às espécies *Brucella abortus*, *Brucella suis* e *Brucella melitensis* (CURRIER 1982). Após o surgimento do primeiro caso de brucelose causada por *Brucella canis* em seres humanos, a doença passou a ser estudada por diversos pesquisadores em diversas partes do mundo (CORTES et al. 1988; BERTHELOT, GARIN-BASTUJI 1993). Vários casos humanos foram relatados na primeira década após o reconhecimento da doença em cães, mas poucos relatos foram feitos nos últimos 20 anos, talvez por não serem pesquisados ou diagnosticados (FEITOSA et al. 1991; CARMICHAEL, SHIN 1996).

A brucelose é uma zoonose de importância mundial pelo prejuízo ocasionado tanto para a saúde pública como para a economia nacional (FEITOSA et al. 1991). Esta característica comum aos outros representantes do gênero *Brucella* foi estabelecida em 1968, com o registro dos primeiros casos da doença em seres humanos (CORTES et al. 1988). Em 1978, foi relatado o primeiro caso humano no Brasil de infecção acidental em laboratório, diagnosticado através de hemocultura e soroaglutinação (GODOY et al. 1979).

É também de fundamental importância conhecer os níveis da prevalência de enfermidades na população canina, assim como possuir formas rápidas e seguras de diagnosticá-las (GERMANO et al. 1987; MOLNÁR et al. 1997).

Atualmente o único reagente para diagnóstico de *Brucella canis* produzido e comercializado no Brasil consiste de um antígeno preparado a partir de um extrato solúvel de *Brucella ovis*, para utilização no teste de imunodifusão em gel de agarose

(IDGA), recomendado pelo setor de Defesa Animal da Secretaria da Agricultura do Estado da Bahia. Esta técnica requer 72 horas para fornecer resultados, podendo existir falsos negativos em decorrência das reações inespecíficas, tornando-se necessário a confirmação através de um teste mais específico (GAD EL-RAB, KAMBAL 1998).

A carência de um método seguro de diagnóstico prático, econômico e sensível tem sido considerado um impedimento a estudos epidemiológicos esclarecedores e importantes para o controle e a prevenção da doença. A proposta deste estudo foi observar o perfil eletroforetico em SDS-PAGE e comparar a reatividade sorológica de cães a antígenos de *Brucella canis* por ELISA Indireto e Western Blotting.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

A *Brucella canis* é um cocobacilo pequeno, aeróbico, gram-negativo, imóvel, com características bioquímicas e morfológicas similares às de outras bactérias do gênero *Brucella* (CARMICHAEL & BRUNER 1968a), mas apresentando diferenças que a classificam em outra espécie (CASTRO & CARMICHAEL 1986; MORENO et al 2002). As *Brucellas sp* não são espécies-específicas, mas têm eletividade de espécie (MOORE 1969; VARGAS 1996). As colônias de *Brucella canis*, da mesma forma que as de *Brucella ovis*, de cor cinza-esbranquiçado ou amarelo-caramelo, atingem de um a dois milímetros após três a cinco dias, apresentam um aspecto naturalmente rugoso (HOFF & NICHOLS 1974; CORRÊA & CORRÊA 1992), tendendo à auto-aglutinação em suspensão (MEDVECZKY & CHICHTON 1986), diferente das colônias lisas das brucellas clássicas, *Brucella abortus* e *Brucella melitensis*, que infectam bovinos, suínos e caprinos (CARMICHAEL & SHIN 1996). Apesar de guardar algumas semelhanças bioquímicas com a *Brucella suis*, a brucella canina é antígenicamente semelhante à *Brucella ovis*, pois falta a ambas o antígeno "O", que compõe as cadeias laterais do lipopolissacarídeo (LPS), presente nas brucellas lisas (MEYER 1983; CARMICHAEL & SHIN 1996). A ausência do ácido ciclopropano, comum às outras espécies na amostra de *Brucella canis*, fornece um método rápido para sua identificação por meio de cromatografia gasosa (CORRÊA & CORRÊA 1992).

A brucelose canina é uma infecção bacteriana contagiosa, zoonótica, causada pela *Brucella canis*, responsável por aborto e infertilidade (LEWIS & ANDERSON 1973; MEYER 1983; CORTES ET AL 1988; SWANGO ET AL 1989; SRINIVASAN ET AL 1992; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996).

Em 1906, foi feito o primeiro diagnóstico de brucelose em cães por meio do isolamento de *Brucella melitensis* em animais de rua na Ilha de Malta (LEWIS & ANDERSON 1973; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993).

A *Brucella canis* foi isolada pela primeira vez em 1966 por CARMICHAEL e reconhecida como uma nova espécie de *Brucella*, associada a casos de aborto e outros distúrbios reprodutivos em cães da raça Beagle (CARMICHAEL & KENNEY 1968b; LEWIS & ANDERSON 1973; MEYER 1983; CORTES et al 1988; FORBES & PANTEKOEK 1988; SWANGO et al 1989; PILLAI et al 1991; SRINIVASAN et al 1992; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993).

O aspecto zoonótico dessa doença infecciosa, comum aos outros representantes do gênero *Brucella* foi estabelecido em 1968, com o registro dos primeiros casos em seres humanos (SCHLEMPER & VAZ 1990). A publicação de vários trabalhos em diferentes países confirma a distribuição mundial da doença (LEWIS & ANDERSON 1973; MEYER 1983; CORTES et al 1988; FORBES & PANTEKOEK 1988; SRINIVASAN et al 1992; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996; GARNIERE et al 2001).

A Infecção de canídeos e de seres humanos no Brasil por *Brucella canis* foram confirmados tanto através de isolamento e tipificação do agente como em investigações sorológicas (GODOY et al 1979; CORTES et al 1988).

O cão foi por muito tempo negligenciado como fonte de infecção de brucelose para o homem devido à sua relativa resistência natural às espécies *B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis* (CURRIER 1982). A doença passou a ser estudada por diversos pesquisadores em diversas partes do mundo, após o surgimento do primeiro caso de brucelose causada por *Brucella canis* em seres humanos (CORTES et al 1988; BOULUS et al 1989; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993). Vários casos da doença em humanos foram relatados na primeira década após o reconhecimento da doença em cães, mas poucos relatos foram feitos nos últimos 20 anos; talvez por não serem pesquisados ou diagnosticados (CARMICHAEL & SHIN 1996). A doença no homem geralmente apresenta sintomatologia mais branda que a produzida por outras espécies de *Brucella* (SWANGO et al 1989) e sua contaminação tem sido relacionada com o manuseio do microorganismo ou de cães infectados (JOHNSON & WALKER 1992).

Levantamentos sorológicos, feitos por meio de testes de aglutinação, sobre a prevalência da doença no homem relatam 0,4% (LEWIS & ANDERSON 1973), 0,54% (HOFF & NICHOLS 1974) e 0,64% (BARG et al 1978) de positivos para *Brucella canis*. O primeiro caso de infecção humana por *Brucella canis* no Brasil foi causada por acidente em laboratório (GODOY et al 1979). No Estado da Bahia,

relataram a ocorrência de 3,85% de soros positivos para *Brucella canis* em seres humanos, pelo método de aglutinação (BARG et al 1981).

Os cães domésticos e canídeos selvagens são os hospedeiros naturais da *Brucella canis* (MOORE 1969). A infecção em cães com outras espécies de *Brucella* raramente acontece, e quando ocorre, é principalmente, em decorrência do contato com animais de fazenda, através da ingestão de leite ou produtos de aborto contaminados (MEYER 1983).

As taxas de prevalência em cães variam segundo a região considerada, a prova de diagnóstico empregada, a intensidade da reprodução e a importância da contaminação de cães de rua. Quando a infecção por *Brucella canis* atinge um canil evolui de forma enzoótica (BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993).

A principal fonte de infecção da *Brucella canis* é o cão macho com infecção inaparente e o cão doente. Este alberga a *Brucella canis* no epidídimo e na próstata podendo eliminar o germe durante um longo período, geralmente de forma intermitente, na urina e principalmente no sêmen, até 60 semanas após o fim da fase bacteriana. Nas fêmeas, a *Brucella canis* pode ser excretada com o aborto e a secreção vaginal durante várias semanas após um aborto aparente ou inaparente (BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996).

A transmissão pode ser direta - pela cópula, ou indireta - inalação ou ingestão de produtos contaminados provenientes de aborto. A contaminação ocorre através das mucosas conjuntivais, orofaríngeas, genitais e principalmente, digestivas (JOHNSON, WALKER 1992; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; NELSON & COUTO 1994).

As células epiteliais coriônicas estão repletas de organismos brucélicos (ACLAND, 1990) por cerca de quatro a seis semanas após o aborto (CARMICHAEL & SHIN 1996). Os cães machos albergam os microorganismos na próstata por longos períodos, eliminando-os na urina meses ou anos após a bacteremia ter cessado (CARMICHAEL & SHIN 1996). Além das fontes citadas anteriormente, a saliva, o sêmen, as fezes (CURRIER 1982) e as secreções nasais também consistem em fontes de infecção (JOHNSON, WALKER 1992).

As bactérias do gênero *Brucella* escapam dos mecanismos normais de defesa do hospedeiro e deste modo sobrevivem e crescem dentro das células fagocíticas (MENDES, MACHADO 1997). A atividade bactericida das células fagocíticas parece ser inibida nas diferentes espécies de *Brucella* através de dois mecanismos já

definidos: o primeiro deles é a suspensão da fusão fagossoma–lisossoma e o segundo é a inibição do sistema microbicida oxigênio-dependente. A resistência adquirida à infecção por *Brucella* envolve imunidade humoral e celular. Os anticorpos dão proteção apenas parcial e são dirigidos, principalmente, contra o lipopolissacarídeo (LPS) (CARMICHAEL, SHIN 1996).

Estudos na Índia sobre a prevalência da doença em cães por meio de sorologia em testes de aglutinação obtiveram 2,18% positivos (PILLAI et al 1991). Estes achados iniciais foram confirmados em 1992, através de outro estudo, encontrado 2% de positivos pelo método de aglutinação (RENUKARADHYA et al 2002). Utilizando a mesma técnica, no Japão foi encontrado 1,69% positivos (KATAMI et al 1991), nos Estados Unidos relatou-se 6% (CARMICHAEL & SHIN 1996). No Brasil foi encontrado 9,1% em animais de canil (LARSSON et al 1981) e 7,5% em cães errantes na cidade de São Paulo (CORTES et al 1988). Na região do Planalto Catarinense, encontraram 6% de cães positivos na zona urbana e 3% na zona rural (SCHLEMPER et al 1990).

Em 1997 houve um estudo de reatividade de soros de cães da Bahia em Monte Gordo com o teste de Imunodifusão em gel de agarose (IDGA) usando o “kit” de reagentes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), teste recomendado pelo Ministério da Agricultura, mostrando uma reatividade de 37% de positividade dos animais testados (MELO et al. 1997). Estudos em 1999 comparando técnicas imunológicas foi encontrado diferentes resultados, sendo: 35,5% na aglutinação em tubo (NVSL - comercial), 33,3% IDGA (Tecpar – comercial), 26,2% em ELISA indireto com antígeno *B. canis* (LABIMUNO) e 12,5% em ELISA indireto com antígeno *B. ovis* (padronizado pelo LABIMUNO com antígeno Tecpar) (MELO 1999).

Tentativas experimentais para infectar gatos, coelhos e primatas não humanos demonstraram a resistência natural de outras espécies animais à infecção por *Brucella canis* (SWANGO et al 1989), observado a bacteremia temporária sem desenvolvimento de doença clínica ou as quantidades significativas de anticorpos (JOHNSON & WALKER 1992). Experimentos realizados com suínos não gestantes, bovinos e ovinos também mostraram grande resistência à infecção (PICKERILL et al 1970).

Estudos mostraram não haver predisposição racial; cães puros e mestiços são igualmente afetados (PILLAI et al 1991). Da mesma forma, confirmou-se não existir predisposição de sexo (MOORE & GUPTA 1970; FREDERICKSON & BARTON 1974). Por outro lado, a maior freqüência de casos se encontra em

animais de 18 a 54 meses, faixa etária na qual têm maior atividade reprodutiva (GERMANO et al 1987) e com alta prevalência em animais criados confinados (VARGAS et al 1996).

A existência de uma parte da população canina reagente para *Brucella canis*, mesmo em pequeno número, deve ser considerada de importância epidemiológica por consistir em fonte de infecção (LEWIS & ANDERSON 1973; POESTER et al 2002).

2.2. ASPECTOS CLÍNICOS

A brucelose canina caracteriza-se por ser uma enfermidade que na maioria dos casos transcorre de maneira oligossintomática (CARMICHAEL & KENNEY 1968; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993) e por apresentar uma longa bacteremia com ausência de febre (CURRIER 1982; MEYER 1983; CARMICHAEL & SHIN 1996). A falta de sinais específicos, além de aborto em fêmeas gestantes e infertilidade em machos, torna difícil o diagnóstico clínico da infecção por *Brucella canis* (MATEU-DE-ANTONIO et al 1993). A linfadenopatia que ocorre no início da infecção normalmente não é detectada pelo proprietário (JOHNSON & WALKER 1992).

A doença deve ser considerada sempre que houver histórico de abortos e baixo desempenho reprodutivo em ambos os sexos (HERMAN & HERMAN 1992; CARMICHAEL & SHIN 1996). Em fêmeas não gestantes, a ausência de sintomas e o ciclo estral que se mantém inalterado dificultam qualquer suspeita clínica (JOHNSON, WALKER 1992). As formas inaparentes são as mais frequentes chegando a mais de 50% para *Brucella canis* (CARMICHAEL 1966; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993).

As *Brucella spp* entram no organismo geralmente por via digestiva, porém nos cães parece ser mais comum por via venérea (MOORE & GUPTA 1970; CORRÊA & CORRÊA, 1992; VARGA et al. 1996), ocorrendo também transmissão congênita e por aerossóis (CURRIER, 1982; VARGA et al. 1996). Ao infectar o animal, as Brucelas penetram nas células epiteliais da pele ou da mucosa; na submucosa são fagocitadas por polimorfonucleares ou por macrófagos teciduais (JOHNSON &

WALKER 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992). Após a infecção, uma bacteremia associada a leucócitos é detectada dentro de duas a três semanas, podendo perdurar de seis meses a mais de um ou dois anos, já tendo sido observado um período de cinco anos (CARMICHAEL & SHIN 1996; CARMICHAEL & KENNEY 1970). A *Brucella canis* costuma ficar localizada na genitália e linfonodos regionais, especialmente nos nodos da cabeça (ACLAND 1998). Nos cães machos, o microorganismo migra para os órgãos reprodutivos causando principalmente orquite e epididimite (CARMICHAEL & KENNEY 1968; HUBBERT 1980; CURRIER 1982; FORBES & PANTEKOEK 1988), podendo ainda causar prostatite, dermatite escrotal (JOHNSON & WALKER 1992), atrofia testicular (FORBES & PANTEKOEK 1988) e anormalidades no sêmen, levando o animal à infertilidade ou subfertilidade (JOHNSON & WALKER 1992). Nas fêmeas as manifestações da doença mais freqüente são: falha reprodutiva, aborto entre o 45° a 55° dia de gestação e metrite (CARMICHAEL 1966; VARGAS et al. 1996; CARMICHAEL & SHIN 1996).

Comumente a *Brucella canis* está disseminada podendo ser encontrada no sangue, nos órgãos internos e humor aquoso, ocorrendo distúrbios não reprodutivos como disco-espondilite, osteomielite, uveíte anterior, dermatite piogranulomatosa, esplenite e meningite (CORRÊA & CORRÊA, 1992; JOHNSON & WALKER 1992). As lesões fetais mais comuns são broncopneumonia, miocardite, hemorragia renal, linfadenite e hepatite (ACLAND 1998).

Os achados histopatológicos mostram linfonodos com um quadro evidente de proliferação de linfoblastos na região dos centros germinativos dos folículos linfóides da cortical, assim como um infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares, caracterizando uma linfadenite purulenta (LARSSON, 1984).

As principais vias de eliminação do microorganismo são restos de materiais de aborto, tais como: feto, placenta e descargas vaginais (JOHNSON & WALKER 1992); estas últimas podendo conter a bactéria por cerca de quatro a seis semanas após o aborto (CARMICHAEL & SHIN 1996), além do colostro e do leite (CURRIER 1982). Machos abrigam os microorganismos na próstata por longos períodos, eliminando-os na urina, meses ou anos após a bacteremia ter cessado (CARMICHAEL & SHIN 1996). A saliva, o sêmen, as fezes (CURRIER 1982) e as secreções nasais também consistem em fontes de infecção (JOHNSON & WALKER 1992).

Após o isolamento da *Brucella canis* no carrapato *Rhiphicephalus sanguineus* proveniente de uma cadela com brucelose, foi levantada a hipótese de que a transmissão do microrganismo através de artrópodes pode ocorrer (PERES et al 1981).

Do ponto de vista econômico, a brucelose canina é uma séria doença de canis de reprodução (BROWN et al 1976; CARMICHAEL & SHIN 1996). Sua ação na produção animal é semelhante àquela causada em outras espécies animais afetadas com outras espécies de *Brucella* (PICKERILL & CARMICHAEL 1972; Garniere).

2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA BRUCELOSE CANINA

O cultivo microbiológico ainda é o método mais confiável e conclusivo para o diagnóstico de *Brucella canis*, confirmando a suspeita clínica quando positivo (BADAKHSH et al. 1981; MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996; GANIERE ET AL 2001). Duas a quatro semanas após o contato, a bacteremia já pode ser detectada pela hemocultura, persistindo por longos períodos de tempo, geralmente mais de um ano (CARMICHAEL & JOUBERT 1988). Porém, é uma técnica demorada e pode dar resultados falso-negativos, sendo necessário incubar as placas por 30 dias antes de ser dado o resultado negativo (JOHNSON & WALKER 1992). Quando encontrado o crescimento do microrganismo, deve-se realizar provas de rotinas em microbiologia, como: coloração pelo gram e provas bioquímicas (verificação da necessidade de CO₂), produção de H₂S, urease, indol, produção de catalase, redução de nitratos, cromobacteriostase e fermentação de glicose (GODOY et al. 1987; MYERS & VARELA-DIÁZ 1980; TOLARI & FARINA 1988).

A grande ocorrência de falsos positivos nos testes sorológicos faz com que a hemocultura torne-se um importante teste confirmatório, sendo necessária para todos os cães que apresentaram resultados positivos nos testes de aglutinação (BARG et al. 1981). Uma hemocultura negativa não exclui a possibilidade de infecção por *Brucella canis* (JOHNSON & WALKER 1992), além disso, o isolamento

da bactéria no sangue é somente possível em animais apresentando títulos elevados à sorologia, iguais ou acima de 1:400 (MOORE & GUPTA 1970; VALENTE et al. 1991).

Os exames laboratoriais de patologia clínica como o hemograma, as provas bioquímicas e a uroanálise comumente apresentam resultados dentro dos valores normais, apesar do caráter sistêmico da infecção brucélica. Pode ocorrer hipergamaglobulinemia (JOHNSON & WALKER 1992).

Os métodos imunológicos diretos e indiretos têm sido amplamente utilizados na pesquisa de antígenos, anticorpos ou imunocomplexos suprimindo as deficiências dos métodos microbiológicos (FERREIRA & ÀVILA 1996).

Alguns testes sorológicos têm sido utilizados para avaliar uma suspeita clínica da doença: RSAT (Teste de aglutinação rápida em lâminas), RSAT - 2-Me (Teste de aglutinação rápida em lâminas com 2-mercaptoethanol) (GEORGE & CARMICHAEL 1978; CARMICHAEL & JOUBERT 1986), TAT - 2-Me (Teste de aglutinação em tubo com 2-mercaptoethanol), AGID (Teste de Imunodifusão em ágar gel) e ensaio imunoenzimático por adsorção em placa (ELISA) indireto (MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996). Destes testes, apenas o teste de aglutinação rápida em placa e aglutinação em tubo, utilizando antígeno obtido a partir de *B. canis* e *B. ovis*, estão disponíveis comercialmente (CARMICHAEL & SHIN 1996).

Os testes sorológicos utilizam antígenos da parede bacteriana, antígenos citoplasmáticos ou ambos, na forma de extrato antigênico. Muitas vezes, os antígenos de parede não são exclusivos de *Brucella canis*, podendo ocorrer reações cruzadas com *Pseudomonas aeruginosa*, espécies mucóides de *Staphylococcus*, *Bordetella bronchiseptica* e com outros microorganismos desconhecidos, gerando falsos positivos (JOHNSON & WALKER 1992; BALDI et al. 1994; CARMICHAEL & SHIN 1996).

O teste de aglutinação rápida em lâmina (D-Tec CB, Symbiotics Corp. San Diego, CA) é bastante sensível e tem sido muito utilizado como teste de triagem, apresentando taxas de falsos negativos em torno de 5%. É considerado rápido e de fácil execução podendo ser encontrado comercialmente (NICOLETTI & CHASE 1988; JOHNSON & WALKER 1992; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996). Os resultados positivos apresentados pelo teste de aglutinação rápida em lâmina precisam ser confirmados por outros métodos (PUE et al. 1986). O RSAT - 2-Me (Teste de aglutinação rápida em lâminas com 2-

mercaptoethanol), proporcionou a redução dos falsos positivos (BADAKHSH et al 1981), pois, o 2-mercaptoethanol quebra as pontes dissulfeto da IgM, responsáveis pela maior taxa de aglutinação inespecífica (BALDI et al. 1994). A substituição do antígeno de *Brucella ovis* por uma variedade menos mucóide de *Brucella canis* também reduziu o número de falsos positivos (MATEU-DE-ANTONIO et al. 1994), porém os falsos positivos persistem e esta técnica deve ser usada apenas para teste de triagem (BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; BALDI et al. 1994).

Outro teste disponível comercialmente, muito utilizado nos E.U.A. para o diagnóstico de brucelose, é o teste de aglutinação em tubo (National Veterinary Services Laboratory – NVSL – US Department of Agriculture, Ames, IA). Apresenta maior especificidade que o teste RSAT (Teste de aglutinação rápida em lâminas), e é indicado para monitorar respostas sorológicas (BROWN et al. 1976). Este teste também foi modificado adicionando 2-mercaptoethanol, reduzindo a taxa de falsos positivos (BADAKHSH et al. 1981, MATEU-DE-ANTONIO et al. 1994). Entre as desvantagens de sua utilização está a dificuldade para detectar baixos títulos de anticorpos que ocorrem na infecção crônica e a possibilidade do fenômeno prozona, além de requerer 48 horas para fornecer o resultado (GEORGE & CARMICHAEL 1974). As taxas de resultados falsos aumentam com amostras hemolisadas (PUE et al. 1986). Os soros que demonstraram prozona no teste de aglutinação em tubo dão resultados positivos no RSAT (JOHNSON & WALKER 1992).

O teste de imunodifusão em gel de agarose (AGID) requer muita experiência na interpretação, sendo extremamente difícil diferenciar as reações falsas positivas das linhas de precipitina formadas com os soros positivos (MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993). Este teste tem sido realizado tanto com a *Brucella canis* como com a *Brucella ovis*, utilizando antígenos de parede, contendo principalmente LPS, ou antígenos citoplasmáticos (FORBES & PANTEKOEK 1988; MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993; CARMICHAEL & SHIN 1996).

Utilizando antígeno citoplasmático, pode-se detectar anticorpos a partir de cinco a dez semanas (CARMICHAEL & SHIN 1996), por até 68 meses pós-infecção mostrando-se adequado para diagnóstico de animais com infecção crônica, quando outros testes dão resultados negativos (PICKERILL 1970). Possui melhor especificidade quando comparado com outros testes, mas ainda não elimina reações com outras Brucellas (JOHNSON & WALKER 1992; MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993).

O ensaio imunoenzimático por adsorção em placa (ELISA) indireto, por ser um método quantitativo mais sensível e específico, tem sido muito usado para diagnóstico de doenças infecciosas dos animais domésticos, mostrando bons resultados no diagnóstico das Brucellas (BERTHELOT & GARIN-BASTUJI 1993; MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993; BALDI et al. 1994; MELO 1999).

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando extrato antigênico de uma cepa variante menos mucóide de *Brucella canis* obtido em salina aquecida com 95,6% de especificidade e 93,8% de sensibilidade foi desenvolvido anteriormente (MATEU-DE-ANTONIO et al. 1993).

A utilização de anticorpos monoclonais específicos para o antígeno “O” de *Brucella abortus* para eliminar o LPS de parede, através de imunoadsorção, contribuiu para a obtenção de proteínas citoplasmáticas purificadas, específicas do gênero *Brucella*, que foram utilizadas num ensaio imunoenzimático (ELISA) bastante aceitável para o diagnóstico de brucelose em cães (BALDI et al. 1997).

O ensaio por DOT-BLOT, em que se utiliza como suporte membranas de nitrocelulose, com pequenas quantidades de amostras, entre 100 a 400 pg, aplicadas como gotas têm-se mostrado um excelente teste com proteínas solúveis no diagnóstico de doenças infecciosas. Desenvolvido por Hawkes e colaboradores em 1982, é uma técnica simples, rápida e sensível que vem sendo utilizada na detecção de anticorpos em vários sistemas e na caracterização de anticorpos monoclonais (SANCHEZ 1996).

Com o objetivo de desenvolver um reagente multiprotéico para o diagnóstico de brucelose, proteínas citoplasmáticas recombinantes de *Brucella sp.* foram testadas em um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto com soros de caprinos, ovinos e bovinos. A melhor especificidade foi obtida com três proteínas recombinantes: p15, p17 e p39 e a combinação de p15-p39 mostrou muito mais sensibilidade que o exame bacteriológico, bem como testes sorológicos clássicos para diagnóstico de *B. ovis* em ovelhas (LETESSON et al. 1997).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polimerase Chain Reaction”) tem sido referida como um teste que identifica o patógeno especificando a cepa de *Brucella*, porém, ainda pouco utilizado na rotina laboratorial (SIFUENTESRINCON 1997). Relatos têm sido feitos sobre resultados de pesquisas de detecção da *Brucella* em amostras de sangue e tecidos por meio de sondas de

DNA e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polimerase Chain Reaction”) (HERMAN & HERMAN 1992; FOX et al 1998).

ASPECTOS GERAIS DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DE *B. Canis* (MELO 1999)

TESTE	Sensibilidade relativa (mg/dL)	Natureza do antígeno	Características básicas
AGID ₁	<1 a 2	Parede celular	Sensível; difícil interpretação; FP
AGID ₂	<1 a 2	Proteínas citoplasmáticas	Altamente específico; eficiente para infecções crônicas; cruza com outras <i>Brucellas</i> .
AGLUTINAÇÃO	0,01	Parede celular	Sensível; FP; necessita confirmação dos positivos
ELISA	<0,001	Parede celular/ proteínas citoplasmáticas	Experimental; bons resultados relatados com LPS de <i>B. canis</i> e proteínas citoplasmáticas de <i>B. abortus</i> .

AGID₁= Imunodifusão em gel de agarose com antígeno de parede

AGID₂= Imunodifusão em gel de agarose com antígeno citoplasmático.

FP= Falsos Positivos

LPS= Lipopolissacarídeo

3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA

O diagnóstico de *Brucella canis* no Brasil, com recomendação do setor de Defesa Animal da Secretaria da Agricultura do Estado da Bahia, é o método de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) utilizando como antígeno produzido a partir de um extrato solúvel de *Brucella ovis* comercialmente disponível (Tecpar-Brasil). A técnica de IDGA apresenta reações inespecíficas, gerando falsos positivos, necessitando de até 72hs para fornecer resultados. Muitas vezes torna-se necessária à confirmação por um teste mais específico.

Os reagentes para testes de aglutinação rápida e lenta não estão, da mesma forma, padronizados e disponíveis comercialmente no Brasil, necessitando protocolos demorados e onerosos para importação, além de também apresentarem o problema de falsa positividade, requerendo posterior confirmação. Apesar de existirem alguns “kits” de diagnóstico de brucelose bovina e ovina por meio de outras técnicas (ELISA e Fixação de Complemento) para importação, não existem registro de reagentes padronizados e disponíveis comercialmente para outros imunotestes de *Brucella canis* disponíveis no mercado nacional ou internacional.

A proposta deste estudo foi estudar dois extratos solúveis obtidos a partir de células de *Brucella canis* e avaliar seu uso em ELISA Indireto. Esse teste, devidamente validado, poderá ser reconhecido para uso comercial, a ser aplicado em estudos epidemiológicos e no controle da doença, bem como na rotina diagnóstico e por clínica de pequenos animais.

4. OBJETIVOS:

4.1. GERAL

Comparar o perfil eletroforetico em SDS-PAGE e a antigenicidade de dois extratos solúveis de *Brucella canis*, preparados de diferentes formas, reconhecidos por Ig G sérica canina.

4.2. ESPECÍFICO

- Preparar extratos solúveis de células de *Brucella canis* tratadas por calos e ultra-som
- Comparar o perfil eletroforético dos extratos em SDS-PAGE
- Testar por ELISA Indireto a imunoreatividade de IgG sérica canina a preparados de células de *Brucella canis*, produzidos pelo Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular- ICS-UFBA;
- Comparar os perfis de reconhecimento de IgG sérica canina aos extratos solúveis por ELISA e Western Blotting.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAS DE SOROS

Foram utilizadas nesse estudo 765 amostras de soros de cães domiciliados da cidade de Salvador e área metropolitana com sorologia desconhecida, 92 amostras de soros testadas pelo método IDGA com antígeno de *Brucella ovis* (Tecpar-Brasil), provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo, sendo 45 positivas e 47 amostras negativas. Para o cálculo do valor de corte foram utilizados 21 amostras de soros de filhotes de cães saudáveis provenientes do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalves Muniz (CPqGM-fiocruz) – Salvador –Ba.

As amostras utilizadas como controles positivo e negativo foram provenientes da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) – Porto Alegre / RS. O controle positivo (Tecpar-Brasil), foi obtido de uma cadela positiva na IDGA com antígeno de *Brucella ovis*, quadro clínico compatível e confirmado pelo isolamento microbiológico. Foram também utilizadas duas amostras de alto e médio título confirmadas por fixação de complemento, segundo as especificações, e amostras utilizadas como controle negativo proveniente do Departamento de Agricultura/USA – Ames, (IOWA) da National Veterinary Laboratory Services –USA (NVSL).

5.2. CULTURAS DE *Brucella Canis*

Colônias de *B. canis* isoladas, identificadas e catalogadas, provenientes de Laboratório de referência (FEPAGRO – RS), foram cultivadas no Laboratório de Bacterioses da Escola de Medicina Veterinária da UFBA e Laboratório de Microbiologia (ICS- UFBA) de acordo com CARMICHAEL et al (1974) e por MATEU de ANTONIO et al (1993), segundo a qual bactérias foram cultivadas em placas contendo o meio ágar triptose por 48 horas a 37°C em aerobiose. As colônias

crecidas foram ressuspensas em salina tamponada com fosfato (STF) 0,15M pH7,2. Aproximadamente 1,5 mL da suspensão bacteriana foram inoculados em frascos de Roux contendo 100 mL de meio e novamente incubados a 37°C por 48 horas. Após a incubação, foram adicionados 10 mL de STF estéril para coleta das colônias crescidas em cada frasco. O material assim removido foi aquecido a 56°C por uma hora para inativação das bactérias, filtrado em gaze estéril e centrifugado a 10.000xg por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a massa bacteriana úmida lavada duas vezes em STF, pesada e congelada a -20°C.

A inativação das bactérias foi conferida por semeadura em meio ágar-triptose durante 72 horas, verificando-se ausência de crescimento.

5.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE *Brucella Canis*

Extratos antigênicos solúveis, obtidos por calor e por ultra-som foram preparados a partir de células de *B. canis* de acordo com a técnica descrita por MYERS et al (1972), com algumas modificações.

Para a dosagem de proteínas de cada extrato, foi utilizado o método de LOWRY et al (1951).

5.3.1- Extrato solúvel obtido por Ultra-som

A massa bacteriana inativada úmida (2g) foi lavada e ressuspensa em 10 mL de STF 0,15M pH7,2 e mantida constantemente em banho de gelo. Foram aplicados três ciclos de 60 segundos a 40Hz em ultra-som (Branson Sonifier 450), com intervalos de um minuto entre os ciclos. A solução de aspecto homogêneo foi então centrifugada 12.000 xg durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi fracionado e congelado a -20°C.

5.3.2- Extrato solúvel obtido por calor

A massa bacteriana inativada úmida (2g) foi lavada e ressuspensa em 10 mL de STF 0,15M pH7,2 e submetidas à temperatura de 120°C em autoclave, durante 20 minutos. Após centrifugação a 12.000 xg durante 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi separado, fracionado e congelado a -20°C.

5.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA INDIRETO)

No ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, delineado de acordo com MATEU-DE-ANTONIO et al (1993) e MELO (1999) foram utilizados o extrato solúvel de *B. canis* obtido pelo calor (Labimuno) e o extrato solúvel de *B. canis* sonificado (Labimuno). Para a padronização da técnica, as concentrações protéicas de antígenos e as diluições do conjugado e dos soros foram determinadas por titulação em série (CARPENTER, 1997). Os extratos solúveis de *B. canis* foram utilizados na concentração protéica de 5,0 µg/mL em microplacas de poliestireno de fundo plano (Corning-USA) de 96 poços. As placas foram sensibilizadas com de 50 µl antígeno em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9.6, e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas cinco vezes com 200µl por poço de STF 0,15M pH7,2 contendo 0,05% de Tween-20 (STF-Tween).

O bloqueio foi feito com 200µL, por poço, da solução de leite desnatado a 5% em STF-Tween 0,05% e incubados em câmara úmida durante duas horas a 37°C e posteriormente lavadas cinco vezes com STF-Tween.

As amostras de soros (padrões e testes) foram adicionadas às placas, em duplicata, no volume de 50µL por poço, diluídas em solução de leite desnatado a 1% em STF-Tween incubadas a 37°C durante 1 hora em câmara úmida. As placas foram lavadas cinco vezes com STF-Tween.

O conjugado (Imunoglobulina de coelho anti-IgG [molécula inteira - H+L] de cão com peroxidase - Sigma nº A-9042) na diluição 1:20.000 em STF-Tween, foi adicionado no volume de 50 µL por poço e incubado a 37°C durante 1 hora em câmara úmida. As placas foram lavadas cinco vezes com STF-Tween.

O revelador contendo substrato e cromógeno (OPD 0,4mg/mL em tampão citrato-cítrico 0,03M contendo H₂O₂ a 0,04%) foi adicionado no volume de 50µL por poço e incubado por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. A reação foi interrompida com 25 µL de H₂SO₂ 4N e a leitura da absorbância foi realizado em Leitor de Elisa (Bio Rad) em filtro de 492 nm.

5.4.1 Cálculo do valor de corte

O cálculo do valor de corte dos testes foi feito de acordo com FREY et al (1998), com base no número de amostras de soros negativos, tendo sido utilizados 21 amostras de filhotes saudáveis, e no intervalo de confiança desejado, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{média das leituras de D.O. dos negativos} + \text{desvio padrão} \times f$$

Onde f = valor determinado em tabela, correspondendo aos níveis de confiança variando de 95% a 99,9% e tamanho da amostra variando de dois a 30 controles, com base na distribuição t de Student.

5.4.2 Cálculo da D.O. corrigida (DOC)

Para cada amostra, a DOC foi determinada multiplicando-se o fator de correção entre placas (FC) pela leitura da D.O. encontrada, que é dado pela fórmula, de acordo com MARGNI (1997):

$$FC = \frac{\text{média da D.O. do positivo-padrão da placa de referência}}{\text{média da D.O. do positivo-padrão de cada placa}}$$

Portanto, $DOC = DO \times FC$

5.4.3. Cálculos estatísticos e de concordância entre antígenos

Os valores de D. O. obtidos nos ELISAs com antígenos solúveis preparados pelo calor e por ultra-som e na IDGA foram comparados entre si por determinação do Índice Kappa de concordância e correlação de Spearman (FISHER 1993; ARMITAGE & BERRY 1994).

5.4.4. Cálculo da especificidade, sensibilidade, valores preditivos e eficiência

Para o cálculo da especificidade, sensibilidade e do valor preditivo, foram utilizados os 92 soros provenientes do CCZ-SP com resultados de diagnóstico por IDGA, teste indicado pelo Ministério da Agricultura do Brasil para diagnóstico de brucelose canina. De acordo com FERREIRA et al (1996), foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{positivos verdadeiros}}{\text{positivos verdadeiros} + \text{negativos falsos}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{negativos verdadeiros}}{\text{positivos falsos} + \text{negativos verdadeiros}}$$

$$\text{Valor preditivo +} = \frac{\text{positivos verdadeiros}}{\text{positivos verdadeiros} + \text{positivos falsos}}$$

$$\text{Valor preditivo -} = \frac{\text{negativos verdadeiros}}{\text{negativos falsos} + \text{negativos verdadeiros}}$$

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{positivos verdadeiros} + \text{negativos verdadeiros}}{\text{positivos verdadeiros} + \text{positivos falsos} + \text{negativos verdadeiros} + \text{negativos falsos}}$$

5.5 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em gel homogêneo de poliácridamida a 12% (12%T, 2,7%C) desnaturante, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), em sistema descontínuo, com 1,5mm de espessura, de acordo com sistema desenvolvido por LAEMMLI (IN: GARFIN 1990; GALLAGHER & SMITH 1991; KITTELBERGER et al 1998). O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4%. O aparato montado contendo os géis foi colocado em um tanque para eletroforese contendo tampão de corrida (TRIS 0,025M; Glicina 0,192M; SDS 0,1%; pH 8.3).

As amostras do extrato de *B. canis* obtidas pelo calor e ultra-som, foram diluídas na proporção de 1:4 no tampão de amostra (2,4 mL de TRIS-HCl 1M pH 6.8; 0,8g de SDS; 18 mg de azul de bromofenol; 4,0 mL de glicerol; 1,9 mL de 2-mercaptoethanol; água destilada q.s.p. 10 mL), aquecidas a 95° C durante 5 minutos e colocadas nos poços formados no gel de empilhamento (cerca de 50µg por poço), da mesma forma que o padrão de peso molecular (LMW – Pharmacia). A corrida foi estabelecida em corrente constante de 20 a 25 mA. Parte do gel foi corado com Azul de Coomassie R250. O gel destinado à técnica de Western Blotting foi eletrotransferido para membrana de nitrocelulose (Millipore) por 60 minutos a 100 V em tampão de transferência (TRIS 0,025M; Glicina 0,193M; Metanol 20% v/v) para a subsequente coloração com Vermelho de Ponceau (S) e reação de “Immunoblotting”.

5.6 WESTERN BLOTTING

Todos os soros positivos e negativos provenientes do CCZ-SP (92 amostras) analisados por ELISA indireto e pela IDGA, foram analisadas no Western blotting, para avaliação da sua reatividade aos extratos solúveis de *B. canis* com protocolos clássicos descritos (TEIXEIRA-GOMES et al 1997; GALLAGHER et al 1998; KITTELBERGER et al 1998) com algumas adequações. Após eletrotransferência, a membrana foi bloqueada com uma solução de leite desnatado a 5% em STF-Tween, por incubação a 4°C, durante toda a noite. A membrana bloqueada foi cortada em tiras de 4-5mm que foram submetidas a cinco lavagens com STF-Tween. As tiras

foram incubadas com os soros (controles negativo, positivo e amostras-testes), diluídos 1:100 em uma solução de leite desnatado a 1% em STF-Tween a 37°C, durante 1 hora. As membranas foram lavadas cinco vezes com STF-Tween. A incubação das membranas com o conjugado (Imunoglobulina de coelho anti-IgG [molécula inteira – H + L] de cão com peroxidase - Sigma nº A-9042), diluído a 1:500 em STF-Tween com BSA foi feita a 37°C, durante 1 hora. As membranas foram lavadas cinco vezes com STF-Tween. Em seguida a solução reveladora foi utilizada diluindo-se a solução-mãe de 4-Cl-1-Naftol (4-Cl-1-Naftol a 0,3% em Metanol) a 1:5 em STF e acrescentando-se 0,3µL/mL de H₂O₂ a 30% durante 15 a 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. As bandas reagentes apresentaram cor visível a olho nu. O substrato foi removido e as membranas lavadas com água destilada. Foram feitos os registros do perfil de bandas que foram reconhecidos pelo soro de cada animal analisado.

6. RESULTADOS

6.1. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO UTILIZANDO EXTRATO SOLÚVEL OBTIDO POR CALOR (ELISA INDIRETO EXTRATO AQUECIDO)

6.1.1. Soros de cães domiciliados

As 765 amostras de soros de cães domiciliados da cidade de Salvador e área metropolitana com reatividade desconhecida para brucelose canina foram testadas por ELISA Indireto com extrato solúvel antigênico obtido por calor a partir de células de *B. canis* (LABIMUNO), utilizado para sensibilizar as placas. A técnica indicou uma positividade de 10% (n=79) com valor de D.O de limite de corte de 0,235 (Tabela 01 e 02).

Os valores das leituras de D.O. variaram de 0,07 a 0,79 (média =0,162; DP = 0,076). As leituras dos soros negativos variaram de 0,07 a 0,235 (média = 0,143; DP = 0,036) e dos soros positivos de 0,237 a 0,7 (média = 0,330; DP = 0,111). A razão entre a media dos positivos e média dos negativos foi de 2,31 e a razão entre a maior D.O. e a media dos negativos foi de 5,52 (Tabela 02).

A distribuição dos resultados do ELISA indireto com preparado antigênico de *Brucella canis* obtido pelo calor das 765 amostras de soros de cães estão demonstradas no Gráfico 01.

6.1.2. Soros de cães testados pelo CCZ-SP por IDGA

Uma amostragem de 92 soros caninos testados pelo método IDGA, no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo diagnosticados como 45 soros positivos e 47 soros negativos, foram testados pelo ELISA Indireto utilizando-se como antígeno extrato solúvel preparado por calor. Dos 45 soros positivos na IDGA apresentaram-se, neste ELISA, como positivos 23 soros e como negativo 22 soros.

Das 47 amostras de soros negativas na IDGA, 3 soros apresentaram-se como positivos e 44 negativos (tabela 03).

6.2. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO UTILIZANDO Extrato ANTIGÊNICO OBTIDO POR ULTRA-SOM (ELISA indireto sonicado).

6.2.1. Soros de cães domiciliados

As 765 amostras de soros de cães domiciliados da cidade de Salvador e área metropolitana com reatividade desconhecida para brucelose canina foram testadas por ELISA Indireto com preparado antigênico obtido por ultra-som a partir de células de *B. canis* (LABIMUNO), utilizado para sensibilizar as placas. A técnica indicou uma positividade de 24% (n=187) com valor de D.O. de limite de corte de 0,350 (Tabela 01 e 02).

Os valores das leituras de D.O. variaram de 0,09 a 1,19 (média =0,285; DP = 0,167). As leituras dos soros negativos variaram de 0,09 a 0,347 (média = 0,211; DP = 0,063) e dos soros positivos de 0,354 a 0,1,19 (média = 0,519; DP = 0,172). A razão entre a média dos positivos e média dos negativos foi de 2,46 e a razão entre a maior D.O. e a média dos negativos foi de 5,64 (Tabela 02).

A distribuição dos resultados do ELISA indireto com preparado antigênico de *Brucella canis* obtido pelo ultra-som nas 765 amostras de soros de cães estão demonstradas no Gráfico 02.

6.2.2. Soros de cães testados pelo CCZ-SP por IDGA

Os 92 soros caninos testados pelo método IDGA, no Centro de Controle de Zoonoses da cidade de São Paulo diagnosticado 45 soros positivos e 47 soros negativos, foram testadas pelo ELISA Indireto, utilizando como antígeno extrato solúvel preparado por ultra-som. Dos 45 soros positivos na IDGA apresentaram-se, neste ELISA, como positivos 31 soros e como negativo 14 soros. Das 47 amostras de soros negativas na IDGA, 8 soros apresentaram-se como positivos e 39 negativos (tabela 04).

Tabela 1. Resultado da reatividade dos soros de cães domiciliados de Salvador e área Metropolitana analisados pelo ELISA Indireto com extrato solúvel de *Brucella canis* obtido pelo calor e ultra-som.

ELISA Aquecido	ELISA Sonicado			
		+	-	
	+	62	17	79
	-	125	561	686
total	187	578	765	

Tabela 2. ELISA Indireto com extrato antigênico de *Brucella canis* obtido pelo calor e ultra-som.

TESTES	ELISA <i>B.canis</i> (Aquecido)	ELISA <i>B.canis</i> (Sonicado)
Limite de corte	0,235	0,350
Percentual dos positivos (%)	10	24
DO média total e desvio padrão total	0,162 (0,076)	0,285 (0,167)
DO média e desvio padrão dos negativos	0,143 (0,036)	0,211 (0,063)
DO média e desvio padrão dos positivos	0,330 (0,111)	0,519 (0,172)
Razão média dos positivos/média dos negativos	2,31	2,46
Razão da maior DO/média dos negativos	5,52	5,64

Tabela 3. Comparação da reatividade dos soros de cães (CCZ-SP) analisados por IDGA (Tecpar-Brasil) e ELISA Indireto com extrato antigênico de *Brucella canis* obtido pelo calor.

IDGA	ELISA Aquecido			Total
		+	-	
+	23	22	45	
-	3	44	47	
total	26	66	92	

Tabela 4. Comparação da reatividade dos soros de cães (CCZ-SP) analisados por IDGA (tecpar-brasil) e ELISA Indireto com extrato antigênico de *Brucella canis* obtido pelo ultra-som.

IDGA	ELISA Sonicado			
		+	-	
+	31	14	45	
-	8	39	47	
total	39	53	92	

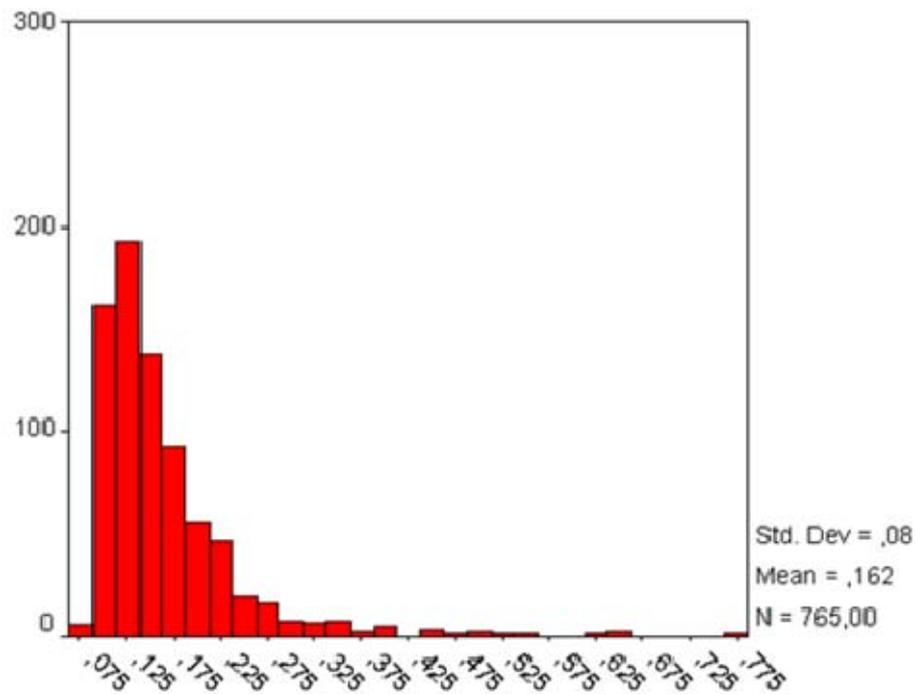


Gráfico 1- Distribuição da frequência dos 765 soros de cães domiciliados em Salvador e Área Metropolitana no ELISA Indireto com extrato solúvel aquecido de *B. canis*

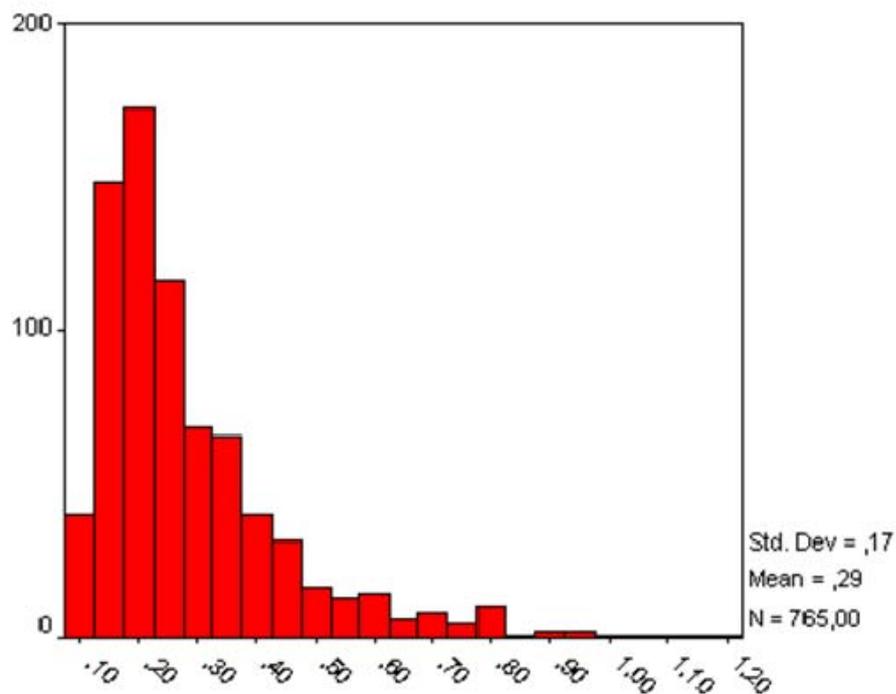


Gráfico 2- Distribuição da frequência dos 765 soros de cães domiciliados em Salvador e Área Metropolitana no ELISA Indireto com extrato solúvel sonicado de *B. canis*

6.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONCORDÂNCIA ENTRE REATIVIDADE ANTIGÊNICA

Para análise estatística de correlação dos resultados encontrados nos estudos das amostras nos ELISAs, utilizando os dois antígenos aquecido e sonicado, foi aplicado o teste de Spearman. O valor encontrado de 0,68 indica correlação média significativa. As distribuições das amostras podem ser observadas no gráfico 03.

A tabela 05 mostra o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência realizados com 92 soros, doados pelo CCZ-SP, com resultados conhecidos pela IDGA, que é atualmente o teste indicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil para diagnóstico de brucelose canina. Observa-se uma sensibilidade de 51% para o ELISA utilizando extrato solúvel obtido por calor (ELISA Aquecido) e 69% para ELISA utilizando extrato solúvel obtido por ultra-som (ELISA Sonicado). A especificidade encontrada foi de 94% para o ELISA Aquecido e 83% para ELISA Sonicado. O valor preditivo positivo foi de 89% para o ELISA Aquecido e 80% para ELISA Sonicado, já o valor preditivo negativo foi de 67% para o ELISA Aquecido e 74% do ELISA Sonicado. A eficiência do ELISA Aquecido foi de 73% e para ELISA Sonicado foi de 76%.

Os valores de Kappa observados na Tabela 06 foram calculados com os resultados dos 765 soros de cães analisados nos ELISAs utilizando extrato solúvel obtido por calor (aquecido) e extrato solúvel obtido por ultra-som (sonicado). Também foram analisados os 92 soros com resultados conhecidos pela IDGA. O índice de concordância entre os testes de ELISA aquecido e sonicado foi de $\kappa = 0,38$. O ELISA aquecido apresentou concordância com a IDGA de $\kappa = 0,45$ e o ELISA sonicado e a IDGA com $\kappa = 0,52$.

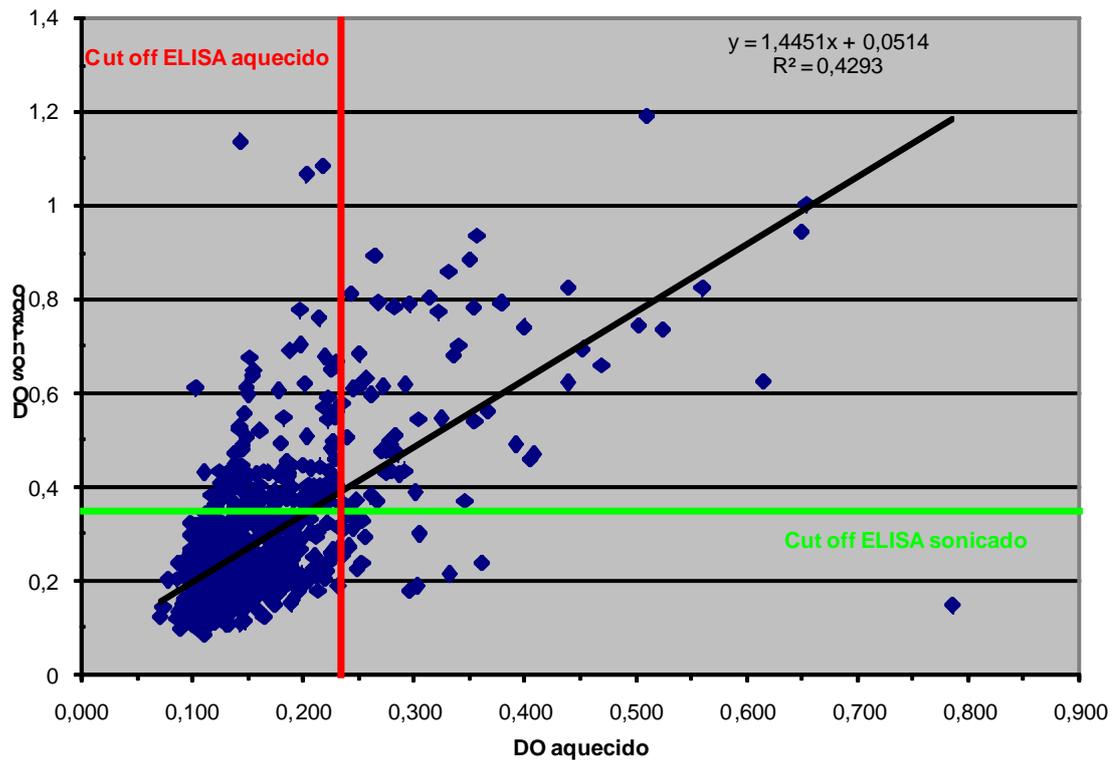


Gráfico 3- Correlação entre reatividade dos soros caninos domiciliados analisados pelos ELISAs Aquecido e Sonicado.

Tabela 5. Análise dos ELISAs com antígenos obtidos de *B. canis* por calor e ultra-som.

TESTES	ELISA <i>B.canis</i> (Aquecido)	ELISA <i>B.canis</i> (Sonicado)
Sensibilidade	51 %	69 %
Especificidade	94 %	83 %
Valor preditivo +	89 %	80 %
Valor Preditivo -	67 %	74 %
Eficiência	73 %	76 %

Tabela 6. Análise da concordância (Kappa) dos testes de reatividade a *Brucella canis* com as amostras de soros de cães.

Testes	Kappa (κ)	n
ELISA Aquecido X ELISA sonicado	0,38	765
ELISA Aquecido X IDGA	0,45	92
ELISA Sonicado X IDGA	0,52	92

6.4. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E WESTERN BLOTTING

Na eletroforese (SDS-PAGE 12%), o extrato aquecido apresentou um perfil de cerca de 15 bandas coradas no gel com Azul de Coomassie com o peso molecular variando aproximadamente entre 90 KDa e 10 KDa. O extrato sonificado na eletroforese (SDS-PAGE 12%) foram observadas cerca de 30 bandas coradas no gel com Azul de Coomassie com o peso molecular variando aproximadamente entre 60 KDa e 10 KDa (Figura 01). O Immunoblotting foi realizado utilizando os soros de animais testados na IDGA (CZZ-SP) e nos ELISAs aquecido e sonificado (Figuras 02 a 06).

No Immunoblotting com o extrato antigênico solúvel de *Brucella canis* obtido por calor (extrato aquecido), os animais positivos, em ambas técnicas, IDGA e ELISA, reagiram fortemente com bandas que variaram de 91 KDa a 11 KDa com maior freqüência as bandas 65 KDa, 58 KDa, 56 KDa, 18 KDa e 12 KDa (Figura 02). Os soros dos animais negativos, na IDGA e no ELISA não reconheceram bandas (Figura 04). Dos soros negativos na IDGA e no ELISA Aquecido, dois soros reagem positivos no Extrato sonificado com bandas de aproximadamente 65 KDa e 58 KDa (Figura 03).

No extrato antigênico solúvel obtido por ultra-som (extrato sonificado) os soros positivos na IDGA e ELISA reagiram fortemente com bandas que variaram de 128 KDa a 12 KDa. As bandas mais freqüentes foram com peso molecular de 68 KDa, 52 KDa, 46 KDa, 38 KDa, 28 KDa, 18 KDa e não apresentaram reação nas membranas incubadas com soros negativos nos mesmos testes sorológicos (Figura 05).

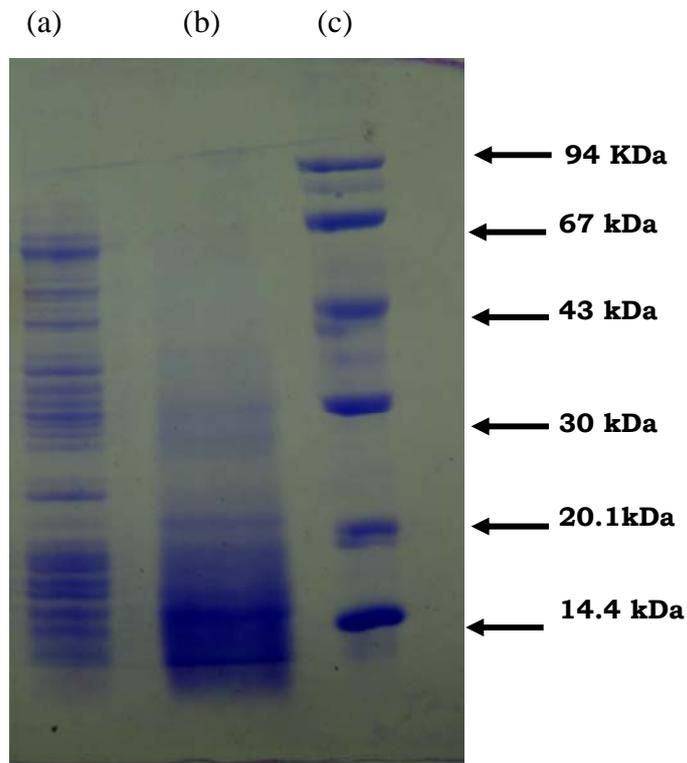


Figura 1. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) corado pelo Coomassie blue R250 com extrato solúvel de *B. canis* obtidos por ultra-som (a), calor (b) e (c) padrão de baixo peso molecular (LMW-Pharmacia).

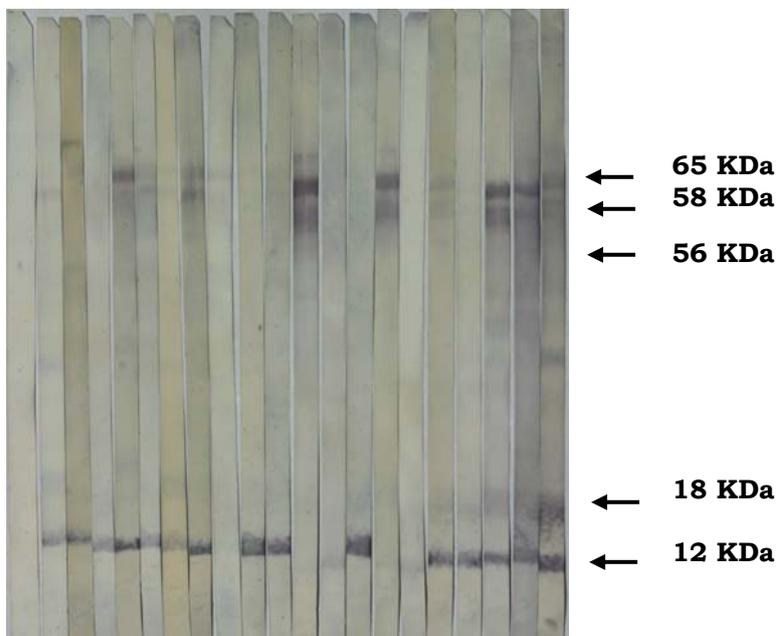


Figura 2. Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por calor em membranas de nitrocelulose com soros positivos na IDGA e ELISA Indireto.

B +



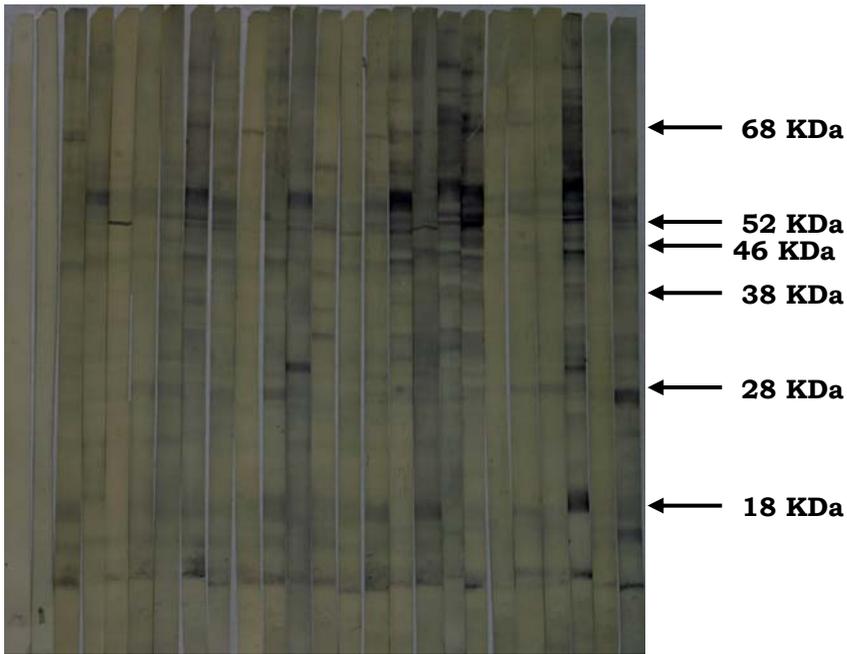
B - +

Figura 3. Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por calor em membrana de nitrocelulose com soros negativos na IDGA , ELISA Indireto com antígeno obtido por calor e positivos ELISA Indireto com antígeno obtido por Ultra-som.



B - +

Figura 4. Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por calor em membrana de nitrocelulose com soros negativos na IDGA e ELISA Indireto.



B - +

Figura 5. Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por ultra-som em membrana de nitrocelulose com soros positivos na IDGA e ELISA Indireto.

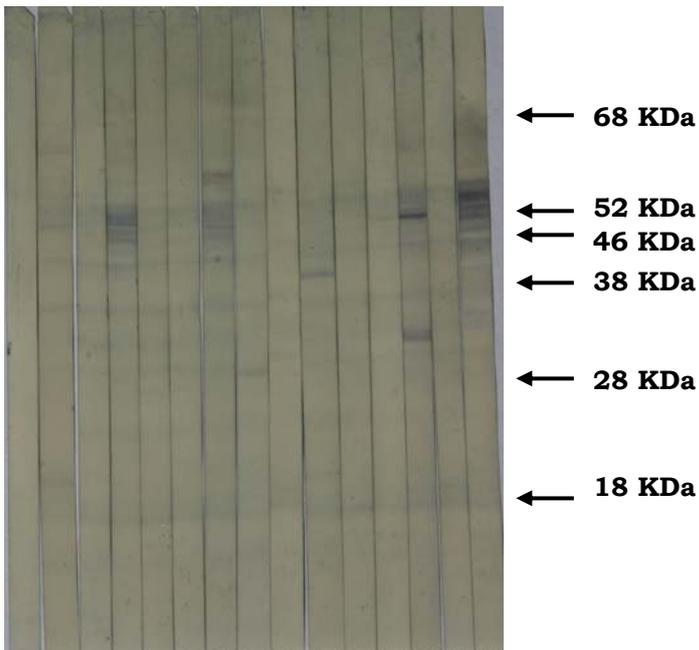


Figura 6. Immunoblotting representativo do extrato solúvel de *B. canis* obtido por ultra-som em membrana de nitrocelulose com soros negativos na IDGA e positivos no ELISA Indireto.

7. DISCUSSÃO

Existe uma grande variedade de antígenos considerados bons, sendo utilizados para o imunodiagnóstico de *Brucella canis*. Sabe-se, entretanto, que os resultados são freqüentemente duvidosos, além da dependência essencial da experiência e perícia técnica e interpretação dos poucos testes comercialmente disponíveis, que são: o Teste rápido de aglutinação em placa com 2-mercaptoethanol (TRAP-2 Me) e o Teste de aglutinação em tubo também com 2-mercaptoethanol (TAT-2 Me). Disponível comercialmente no Brasil encontra-se a Imunodifusão em gel de agarose (IDGA), teste recomendado para o diagnóstico de brucelose canina pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

O isolamento com identificação da bactéria continua sendo o método indicado para confirmação segura do diagnóstico. Apesar de ser demorado, trabalhoso, requer pessoal especializado podendo ocorrer falsos negativos por falha nas fases abacterêmicas da doença. Em decorrência do diagnóstico clínico ser muito difícil, torna-se necessário o auxílio de métodos laboratoriais que possibilitem seu esclarecimento. A sorologia consiste no método atual utilizado para avaliação de cães reprodutores antes de sua atividade ou para confirmação da suspeita clínica de brucelose. Alguns testes sorológicos vêm sendo empregados por vários pesquisadores em todo o mundo, mas ainda não se obteve uma técnica ideal (MATEU-DE-ANTONIO et al 1993; BALDI et al 1994; CARMICHAEL & SHIN 1996).

As diferentes técnicas empregadas no diagnóstico e atualmente disponíveis no comércio internacional, apresentam características e princípios diversos. Os TRAP, TAT, IDGA são técnicas de interação secundária que precisam ser mais bem discutidas e redirecionadas quando os resultados são negativos. Por apresentarem diferenças nas reações em presença de excesso de antígenos ou de anticorpos nos casos de soros com resultados negativos, os mesmos devem ser titulados e submetidos repetição do teste. Já os ELISAs, Immunoblotting, Western blotting a titulação é indicada em situações especiais de padronização de limites de corte das reações (CARMICHAEL & SHIN 1996).

Outros fatores, como a hemólise, interferem em quase todos as técnicas de interação secundária, não tendo sido observado nas execuções técnicas ou nas revisões de interações primárias.

Antígenos de parede celular de *Brucella ovis*, contendo principalmente lipoproteínas e LPS específicos de cepas rugosas do gênero *Brucella*, utilizados nos testes de interação secundária, reagem com anticorpos que aparecem na fase inicial da infecção, a partir de cinco semanas após o contato com o agente. Entretanto, é difícil definir as linhas de precipitação decorrentes de reações específicas, cuja diferenciação das linhas inespecíficas (positivos falsos) depende da aparência das linhas de identidade parcial (MELO 1999). Tal aspecto é ainda mais evidente em soros provenientes de animais em fases muito precoces ou fases crônicas da infecção (CARMICHAEL & SHIN 1996).

Antígenos citoplasmáticos de *B. canis*, livres de LPS, foram preparados na busca de maior especificidade e capacidade de detectar anticorpos por longos períodos de tempo, não identificando, entretanto, infecções com menos de dois meses de duração - fase em que outros testes dão resultados positivos ou suspeitos (BALDI et al 1994). Estes antígenos, livres de LPS, não permitem a diferenciação entre *Brucella canis* e as outras espécies desse gênero, (MATEU-DE ANTONIO et al 1994).

A utilização do ELISA apresenta uma série de vantagens sobre os outros testes. É uma técnica mais sensível, sendo capaz de detectar anticorpos em níveis menores do que outras técnicas; o que ocorre com soros positivos de baixo título (GAD EL-RAB & KAMBAL 1998). Há ainda a possibilidade levantada e discutida na última década de, pelo título de anticorpos reagentes, se identificar o estágio da doença e avaliar a magnitude da resposta imune do paciente (BALDI et al 1994).

O uso de antígenos citoplasmáticos e de parede, utilizando outras cepas de *Brucella*, no ELISA vem sendo estudado por vários autores. BALDI et al (1997), utilizaram antígenos citoplasmáticos e demonstraram a satisfatória eficiência da técnica. MATEU-DE-ANTONIO et al (1993), porém, descreveram a pobre capacidade de adsorção desse antígeno à placa de poliestireno. O ELISA indireto com extrato bacteriano de *Brucella canis* obtido por calor, mostrou ser promissor como técnica prática, rápida, sensível e objetiva (MELO 1999).

Existem publicações elucidando as vantagens do uso de proteínas específicas recombinantes para sensibilizar placas em ELISAs Indiretos (BALDI et al 1997;

LETESSON et al 1997), mas sua produção ainda demanda equipamentos dispendiosos de tecnologia de ponta. Apesar de alguns estudos evidenciarem uma redução da sensibilidade devido a importante perda de determinantes conformacionais no processo de obtenção do antígeno, possivelmente, será no futuro uma alternativa tecnicamente próxima do ideal (KITTELBERGER et al 1998).

A partir de colônias isoladas de um animal infectado no Brasil (FEPAGRO-RS) descartou-se a necessidade de importação de colônias desenvolvidas e comercializadas internacionalmente para a produção de antígenos. Neste trabalho os dois extratos antigênicos obtidos por métodos diferentes foram destinados a sensibilização de placas para ELISA Indireto e posteriormente comparados.

Os dados da reatividade nos ELISAs neste trabalho foram comparados com os dados obtidos pelo CCZ-SP por ser um órgão de controle de zoonoses e que utiliza a IDGA/TECPAR recomendado pelo Ministério da Agricultura. O extrato solúvel de *Brucella canis* submetido ao calor quando comparado com os resultados da IDGA/TECPAR, obteve a sensibilidade de 51%, especificidade de 94% e índice Kappa de concordância de 0,45, considerado moderado. Estes dados diferem dos achados de MELO (1999), que comparavam os resultados da IDGA/TECPAR, com ELISA utilizando antígenos obtido por calor, obtendo 91% de especificidade e 95% de sensibilidade. Mostrou também, na suas condições de amostragem, um índice Kappa de concordância de 0,84, considerado excelente. Provavelmente a variação dos dados obtidos com a mesma cepa e condições deve-se a variação da amostragem utilizada, uma vez que os soros eram de outra procedência e o número de amostras muito menor. A análise de sensibilidade e especificidade do presente trabalho utilizou um número de animais bem maior do que utilizado no período por MELO 1999. O teste de IDGA não demonstrou ser um teste de referência para a utilização do cálculo de especificidade e sensibilidade.

Analisando os resultados do ELISA utilizando o extrato solúvel obtido por ultra-som a partir de *Brucella canis* com os resultados da IDGA/TECPAR, o ELISA obteve sensibilidade de 69%, especificidade de 83% e índice Kappa de concordância de 0,52, também considerado moderado.

Os valores devem ser recalculados a partir da reatividade de soros provenientes de animais diagnosticados por isolamento bacterianos ou por PCR.

O ELISA Indireto utilizando antígeno obtido por ultra-som a partir de *Brucella canis*, que contém uma quantidade maior de proteínas, apresentou níveis muito

elevados de leituras de DO, com o seu limite de corte determinado em 0,350 a 492 nm, bastante superior ao do outro ELISA com antígenos obtidos por calor, que foi determinado em 0,235 nas mesmas condições. Mesmo havendo vários critérios para a eleição do grupo de amostras negativas destinado ao cálculo do valor do limite de corte, a seleção, para esses ELISAs, de soros de filhotes saudáveis de animais controle de biotério eleito para cálculo é justificado pela bibliografia que afirma que a maior frequência de casos encontra-se em animais em idade reprodutiva entre 18 e 24 meses.

Mesmo que o extrato antigênico tratado por ultra-som não seja livre de LPS, o que diminuiria sua especificidade para o diagnóstico da brucelose canina segundo GEORGE & CARMICHAEL (1978), parece ser melhor que o obtido por calor.

Estudos nas Técnicas de SDS-PAGE e “Immunoblotting” para a comparação dos perfis eletroforéticos e reatividade dos extratos solúveis utilizados nos ELISAs evidenciou a presença da maioria das bandas com diferentes pesos moleculares, sugerindo diferenças nas composições e conseqüentemente na antigenicidade.

O aquecimento, a presença de lipídios, lipoproteínas ou LPS pode dificultar o “carregamento” de cargas negativas e assim impossibilitar de anular as outras características da proteína além do peso molecular. O aquecimento pode desnaturar tanto a proteína que, mesmo que ela fosse originalmente a mesmo componente do extrato obtido por ultra-som não poderia ser identificado no reconhecimento do imunoblotting com soros de animais.

A reatividade específica dos dois extratos solúveis foi analisada no “Immunoblotting” utilizando os soros de animais testados na IDGA (CZZ-SP) e ELISAs aquecido e sonicado.

Para o extrato solúvel obtido por calor, foram observadas bandas específicas de aproximadamente 65 KDa, 58 KDa, 56 KDa, 18 KDa e 12 KDa. Os animais negativos, tanto para a IDGA e ELISA não reconheceram bandas no “Immunoblotting” para o preparado antigênico de *Brucella canis* obtido por calor. Provavelmente 2-mercaptoethanol e o SDS desfaçam algumas ainda mais determinantes tornando-os não reconhecidos, a diferença do que ocorre com a reatividade no ELISA.

No extrato solúvel obtido por ultra-som os soros positivos para IDGA e ELISA foram classificadas como específicas as bandas com peso molecular de 68 KDa, 52 KDa, 46 KDa, 38 KDa, 28 KDa, 18 KDa. Estas bandas foram reconhecidas com

maior freqüência pelos soros positivos e ausentes nas membranas dos soros negativos nos testes sorológicos.

Apenas uma proteína com aproximadamente 18 KDa reativa nos dois extratos antigênicos solúveis foi reconhecida pelos soros positivos.

O presente estudo concorda com os dados de CARMICHAEL et al 1989 que caracterizou antígenos de *Brucella canis* utilizando soros de cães infectados e também reconheceu as bandas de 18 KDa e 68 KDa no antígeno citoplasmático. MELO 1999, caracterizou como específicas no extrato protéico obtido por calor apenas as bandas de 61 KDa e 55 KDa, em análise com um número menor de soros quando comparados com o nosso estudo. Já no extrato protéico obtido por ultrassom, o mesmo estudo descreve apenas 46 KDa, 38 KDa e 28 KDa.

BALDI em, 1997, descreve a utilização de uma proteína citoplasmática com 18 KDa de *Brucella spp* para utilização em Elisa para diagnóstico de brucelose canina.

8. CONCLUSÕES

- Os soros de cães domiciliados testados apresentaram diferentes porcentagens de positividade nos ELISAs, sendo de 10% com extrato solúvel obtido por calor e 24% por ultra-som;
- A análise estatística de correlação dos resultados encontrados nos estudos dos dois antígenos obtido por calor e ultra-som indicou uma correlação média significativa;
- A sensibilidade do ELISA utilizando extrato solúvel obtido por calor -ELISA Aquecido- foi menor (51%) que o ELISA utilizando extrato solúvel obtido por ultra-som - ELISA Sonicado (69%);
- A especificidade encontrada foi de 94% para o ELISA Aquecido e 83% para ELISA sonicado;
- O valor preditivo positivo foi de 89% para o ELISA Aquecido e 80% para ELISA Sonicado;
- O valor preditivo negativo foi de 67% para o ELISA Aquecido e 74% para ELISA Sonicado;
- A eficiência do teste para o ELISA Aquecido foi ligeiramente menor (73%) que a do ELISA Sonicado (76%);
- Os antígenos utilizados para os ELISAs Aquecido e Sonicado, mostram diferentes perfis eletroforético em análise pela técnica SDS-PAGE.
- A imunoreatividade do extrato antigênico solúvel de *B. canis* obtido por calor (extrato aquecido), utilizando soros de animais positivos na IDGA e ELISA,

apresentou com maior frequência as bandas 65 KDa, 58 KDa, 56 KDa, 18 KDa e 12 KDa e o extrato obtido por ultra-som as bandas 68 KDa, 52 KDa, 46 KDa, 38 KDa, 28 KDa, 18 KDa;

- O extrato preparado através do ultra-som apresentou-se melhor reagente que o preparado pelo calor com os soros testados;
- O teste ELISA Indireto com os extratos solúveis obtidos a partir de células de *B. canis* mostrou ser uma técnica viável, porém necessita ser avaliado com soros de animais diagnosticados por isolamento bacterianos ou por PCR.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Submeter os ELISAs a uma nova análise utilizando soros de cães positivos confirmados por isolamento da *B. canis* ou por PCR;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, P.; BERRY, G. Statistical Methods in Medical Research. 3 Ed. New York. Blackwell Source Ltda. 1994. 923p.

ACLAND, H. M. Sistema Reprodutor do macho. In: CARUTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médica Sul, 1998. 672 p. p. 573 – 589.

BADAKHSH, F. F.; CARMICHAEL, L. E.; DOUGLAS, J. A. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.15, n.2, p.286-289. 1981

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. *Veterinary Microbiology*, V.41, p.127-134. 1994.

BALDI, P.C.; WANKE, M. M.; LOZA, M. E.; MONACHESI, N.; FOSSATI, C. A. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of Brucella spp. *Veterinary Microbiology*, V.51, p.273 - 281, 1997.

BARG.; GODOY, A. M.; GRANDI,. Pesquisa de aglutininas para Brucella abortus e Brucella canis em soros escolares no Estado de Santa Catarina. *Arq. Esc. Vet. UFMG*. v.30, n.3, p.307-310. 1978.

BARG, L.; GODOY, A. M.; GRANDI, T. S. M. Pesquisa de aglutininas anti-Brucella abortus e anti-Brucella canis em soros humanos procedentes do Estado da Bahia - Brasil. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.33, n.1, p. 43-50. 1981.

BERTHELOT, X, GARIN-BASTUJI, B. Brucelloses canines. *Le Point Veterinaire*, v.25, n.152, p. 125-129, 1993.

BOULUS, M. Caso de infecção humana pela B. canis. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA VETERINÁRIA TROPICAL, 25, 1989, Florianópolis. Anais... Florianópolis: 1989. v. 1. p.188.

BROWN, J.; BLUE, J. L.; WOOLEY, R. E.; DREESEN, D. W.; CARMICHAEL, L. E. A serologic survey of a population of Georgia dogs for Brucella canis an evaluation of the slide agglutination test. *JAVMA*, v. 169, n.11, p.1214-15, 1976.
CARMICHAEL, L. E. Abortion in 200 Beagles. *JAVMA*, v. 149, n.8, p.1126, 1966.

CARMICHAEL, L. E; BRUNER D. W. Characterization of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.*, v. 58, p.579-592, 1968a.

CARMICHAEL, L. E; KENNEY, R. M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *JAVMA*, v. 152, n.6, p. 605-616, 1968b.

CARMICHAEL, L. E; KENNY, R. M. Canine brucellosis: The clinical disease, pathogenesis and immune response. *JAVMA*, v.154, n.12, p.1726-35, 1970.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet.*, V.77, p.3-12, 1986.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet.*, v. 78, p. 63-73, 1988.

CARMICHAEL, L. E.; SHIN, S. J. Canine Brucellosis: A Diagnostician's Dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v. 11, n.3, p.161-165, 1996.

CASTRO, R. F.; CARMICHAEL, L. E. Properties of strains of *Brucella canis*. *Revista Latino-americana de Microbiologia*, v.28, n.2, p.145-151, 1986.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 843 p. Cap: 20. Bruceloses. p. 195 – 215.

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

CURRIER, R. W. Canine brucellosis. *JAVMA*, v.180, n.2, p.132-133, 1982.

FEITOSA, M. H.; BITTAR, C. R.; GOMES, S. P. Brucelose: levantamento sorológico no estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. *Vet. e Zoot. São Paulo*, v. 3, p.9-15, 1991.

FERREIRA, W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. 302 p. Cap.: 1. Sorologia: Importância e Parâmetros. p. 1 – 6.

FISHER, L. D., BELLE, G. V. Biostatistics. A methodology for the health sciences. USA: John Wiley & Sons, 1993. 991p.

FORBES, L. B.; PANTEKOEK, J. F. Brucella canis isolates from canadian dogs. Canadian Veterinary Journal, v. 29, n.2, p. 149-152, 1988.

FOX, K. F.; FOX, A. ;NAGPAL, M.; STEINBERG, P.; HEROUX, K.; Identification of Brucella by Ribosomal-Spacer-Reion PCR and differentiation of Brucella canis from Other Brucella ssp. Pathogenic for humans by carbohydrate profiles. Journal of Clinical Microbiology. V. 36, n. 11, p 3217-3222, 1998

FREDRICKSON, L. E., BARTON, C. E. A serological survey for canine brucellosis in a metropolitan area. JAVMA. v. 165, n.11, p. 987-989. 1974.

FREY, A. et al. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. Journal of Immunological Methods. v.221, p.35-41. 1998.

GAD EL-RAB, M. O.; KAMBAL, A. M. Evaluation of a Brucella Enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. Journal of Infection, v.36, p.197-201, 1998.
GANIERE, J. P.; RUVOEN, N.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; Zoonoses infectieuses d'origine canine et feline. Méd Mal Infect., p. 109-125, 2001.

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. Development of a rose bengal stained plate – test antigen for the rapid diagnosis of Brucella canis infection. The Cornell Veterinarian, v. 68, n.4, p.530-543, 1978.

GERMANO, P. M. L.; VASCONCELLOS, S. A.; ISHIZUKA, M. M.; PASSOS, E. C.; ERBOLATO, E. B. Prevalência de infecção por Brucella canis em cães na cidade de Campinas, São Paulo - Brasil. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo, v. 24, n.1, p. 27-34, 1987.

GODOY, A. M.; PERES, J. N.; BARG, L. Isolamento de Brucella canis em Minas Gerais - Brasil. Arq. Esc. Vet. UFMG, v. 29, n.1, p. 27-34, 1987.
GODOY, A. M.; NEVES, J.; PERES, J. N.; BARG, L Sobre um caso de infecção humana por Brucella canis em laboratório. Arq. Esc. Vet. UFMG. v. 37, n.2, p. 140-145. 1979

HERMAN, L.; HERMAN, D.R. Identification of *Brucella* spp. by using the Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.6, p.2099-2101, 1992.

HOFF, G.; NICHOLS, J. Canine brucellosis in florida: serological survey of pound dogs, animal shelter workers and veterinarians. *American Journal of Epidemiology*, v. 100, n.1, p.35-39, 1974.

HUBBERT, N. L.; BECH-NIELSEN, S.; BARTA, O. Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serological test results. *JAVMA*, v. 177, n.2, p.168-171, 1980.

JOHNSON, C. A.; WALKER, R. D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, v. 14, n.6, p. 763-767, 770-772, 1992.

KATAMI, M.; SATO, H.; YOSHIMURA, Y.; SUZUKI, T.; NAKANO, K.; SAITO, H. 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. 1113-15, 1991.

LARSSON, M. H. M.; LARSSON, C. E.; MIRANDOLA, R. M. S.; YASSUDA, P. H.; GRUTOLA, G. Canine brucellosis in São Paulo: serologic survey of kennel and stray dogs. *Int. J. Zoon.*, v. 8, p. 85-90, 1981.

LARSSON, M. H. M.; LARSSON, C. E.; COSTA, E. O.; GUERRA, L. J.; HAGIWARA, M. K. Brucelose canina experimental: Estudo bacteriológico, sorológico e anatomopatológico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 2 n. 36, p. 141 – 156, 1984

LETESSON, J.J.; TIBOR, A.; EYDER, G.; WANSARD, V.; WEYNANTS, V.; DENOEL, P.; SAMAN, E. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.4, n.5, p.556-564, 1997.

LEWIS, G. E.; ANDERSON, J. K. The incidence of *Brucella canis* antibodies in sera of military recruits. *AJPH*, v. 63, n.3, p.204-205, 1973.

LOWRY, O. H.; ROSEMBROGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, v.193, p.265-275, 1951.

MARGNI, R. A. *Inmunologia e Imunoquímica fundamentos*. 5 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1996. 976 p.

MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; MARTIN, M.; SOLER, M. Use of indirect enzyme-linked 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.; MARTIN, M.; CASAL, J. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*; v.6, p.257-259, 1994.

MEDVECZKY, N. E.; CHICHTON, R. The application of a serological test to screen dogs entering Australia for antibody to *Brucella canis*. *Australian Veterinarian Journal*, v. 63, n.11, p.375-377, 1986.

MEYER, M. E. Update on canine brucellosis. *Modern Veterinary Practice*, v. 64, n.12, p. 987-989. 1983.

MELO, S. M. B; NASCIMENTO, R. M.; AGUIAR, P. H. P.; FREIRE, S. M. Avaliação sorológica por imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de *Brucella canis* em cães do Distrito de Monte Gordo, Camaçari, Bahia. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária / UFBA, Salvador*, v. 19, n.1, p.119 – 127, 1997.

MELO, S. M. B Desenvolvimento de um teste Elisa indireto para imunodiagnóstico de Brucelose canina e sua comparação com outros testes imunológicos. Salvador, 1999. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, 1999.

MENDES, R. P.; MACHADO, J. M. Brucelose. In: VERONESI, R.; FOCACCIO, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo; Atheneu, 1997. 1803 p. p. 575 – 582.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TUTY, E.; SOUSA, J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. *Ver. Bras. Med. Vet.*, v.19, n.4, 157-162, 1997.

MOORE, J. A. *Brucella canis* infection in dogs. *JAVMA*, v. 155, n.12, p.2034-2037, 1969.

MOORE, J. A.; GUPTA, B N. Epizootiology, diagnosis and control of *Brucella canis*. *JAVMA*, v. 156, n.12, p.1737-1740, 1970.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. *Brucella* evolution and taxonomy, *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 209-207, 2002.

MYERS, D. M.; VARELA-DIÁZ, V. M. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. *Cornell Veterinarian*, v.70, n.3, p.258-265, 1980.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 737 p. Cap: 62. Infecções Genitais e Tumor Venéreo Transmissível. P. 522 – 525.

NICOLETTI, P.; CHASE, A. Avaliação dos métodos de diagnóstico da infecção por *Brucella canis* em cães. *Rev. Cães e Gatos*, v.6, n.6, p.21-23, 1988.

PERES, J. et al. Isolamento de *Brucella canis* de carrapatos *R. sanguineus*. *Arq. Esc. Vet, UFMG*. v. 33, n.1, p. 51-55. 1981.

PICKERILL, P. A. Comments on Epizootiology and Control of canine brucellosis. *JAVMA*, v. 156, n.12, p. 1741-1742, 1970.

PICKERILL, P. A.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis control programs in commercial kennels and effect on reproduction. *JAVMA*, v. 160, n.12, p. 1607-1615, 1972.

PILLAI, M. T.; NEDUNCHELLYAN, S.; RAGHAVAN N. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of dogs in Madras. *Indian Veterinary Journal*, v. 68, n.5, p. 399-402, 1991.

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

PUE, H. L.. et al. Detection of antibodies against *Brucella canis* in dogs. *Modern Veterinary Practice*. July/August, p. 612-614. 1986.

RENUKARADHYA, G. J.; ISLOOR, S.; RAJASEKHAR, M.; Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in Índia. *Veterinary Microbiology*, v. 90, p. 183-195, 2002.

SANCHEZ, M. C. A. Testes Sorológicos. In: FERREIRA, W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. 302 p. p. 7- 28.

SCHLEMPER, S. R. M., VAZ, A. K. Inquéritos sorológicos para brucelose canina por *Brucella canis* na região do planalto catarinense - Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* v. 12, p. 8-12. 1990.

SIFUENTESRINCON A. M.; REVOL A.; BARRERASALDANA H. Á. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction, *Molecular Medicine*. V. 3, n.11, p.734-739, 1997.

SRINIVASAN, V. K.; NEDUNCHELLIAN, S.; VENKATARAMAN, K. S. Seroepidemiology of canine brucellosis in Madras city. *Indian Veterinary Journal*, v. 69, n.11, p. 978-980, 1992.

SWANGO, L.J. Bacterial, rickettsial, protozoal, and miscellaneous infections. In: ETTINGER, S. J. *Textbook of veterinary internal medicine*. 3.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1989. v.I. 1200p., p. 270-271.

TOLARI, F.; FARINA, R. Methods for the identification of *Brucella* isolates in use at the animal pathology department Università di Pisa. Results of eight years activity. *Annali della Fac. Med. Vet. Pisa*. n.41, p.227-232. 1988.

VALENTE, C.; GIALLETTI, L.; CAPUA, I.; ANTOGNONI, M. T. Brucellosis del cane. Indagine sierologica e batteriologica per *Brucella canis*. *Archivio Veterinario Italiano*, v.42, n.3, p.135-139, 1991.

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

PUBLICAÇÃO

Available online at www.sciencedirect.com

Research in Veterinary Science 83 (2007) 340–346

www.elsevier.com/locate/rvsc

Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*

Stella Maria Barrouin-Melo ^{a,*}, Fernando Padilla Poester ^b, Marcos Borges Ribeiro ^c, Adriano Costa de Alcântara ^c, Paulo Henrique Palis Aguiar ^a, Ivana Lúcia Nascimento ^c, Robert Eduard Schaer ^c, Roberto Meyer Nascimento ^c, Songelf Menezes Freire ^c

^a Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros, 500, Salvador, BA, CEP 40170-110, Brazil

^b Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (FEPAGRO), Estrada do Condô, 6000, Eldorado do Sul, RS, CEP 92990-000, Brazil

^c Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vale do Canela SIN, Salvador, BA, CEP 40110-100, Brazil

Accepted 19 February 2007

Abstract

An indirect ELISA test was developed for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. A bacterial whole cell extract was used as a solid phase antigen, using *B. canis* isolated from an infected animal. Sera from culture-positive and healthy negative animals were used as internal reference controls. The cut-off point was determined by a mathematical formula for a statistically valid value, which defined the upper prediction limit, based on the upper tail of the *t*-distribution of 21 negative control sera readings, for the confidence level of 99.5%. The sensitivity and specificity of the ELISA test were 95% and 91%, respectively. The ELISA test showed a significant concordance index ($K = 0.84$) with the agar gel immunodiffusion test. The reliability of the ELISA for the detection of infected animals was established by a double blind study testing 280 sera provided by serum banks from different diagnostic and research institutions and analyzed by ROC Curve.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Brucella canis*; ELISA; Serodiagnosis; Canine brucellosis

1. Introduction

Canine brucellosis is a zoonotic bacterial infection whose clinical diagnosis is difficult to perform (Berthelot and Garin-Bastuji, 1993; Mateu-de-Antonio et al., 1993; Carmichael and Shin, 1996). Human infections have been

reported, being laboratory technicians and dog owners the most exposed to *Brucella canis* (Godoy et al., 1977; Lucero et al., 2005). The disease has a worldwide distribution and represents a great cause of economic losses in breeding kennels (Carmichael, 1966; Wanke, 2004). Despite serological tests are routinely used, the blood culture is considered the only definitive test for the diagnosis of canine infection (Carmichael and Shin, 1996; Baldi et al., 1997; Wanke, 2004). Clinical canine brucellosis is commonly confirmed by different serological tests, which include: (i) tube agglutination test (TAT); (ii) rapid plate agglutination test (RPAT), both with or without addition of 2-mercaptoethanol; and, (iii) agar gel immunodiffusion

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; AGID, agar gel immunodiffusion; TAT, tube agglutination test; *B. canis*, *Brucella canis*; *B. ovis*, *Brucella ovis*; OD, optical density

* Corresponding author. Tel.: +55 71 3263 6705; fax: +55 71 3263 6718. E-mail address: barrouin@ufba.br (S.M. Barrouin-Melo).

0034-5288/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.rvsc.2007.02.006

test (AGID), using antigens prepared either with *B. canis* or *Brucella ovis* (Serikawa et al., 1989; Baldi et al., 1994, 1997; Carmichael and Shin, 1996; Lucero et al., 2002). Cross-reactions are common, occurring with bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*, mucoid *Staphylococcus* spp., and *Bordetella bronchiseptica* among others, producing false positive results (Johnson and Walker, 1992; Mateu-de-Antonio et al., 1993; Baldi et al., 1994; Carmichael and Shin, 1996).

Tests like the counterimmunoelectrophoresis (Myers and Varela-Diaz, 1980), the indirect immunofluorescence, the complement fixation test (Schlemper and Vaz, 1990; Johnson and Walker, 1992; Carmichael and Shin, 1996) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Berthelot and Garin-Bastuji, 1993; Baldi et al., 1994) have shown to be effective for the diagnosis of *B. melitensis*, *B. ovis* and *B. abortus*.

Several authors have recommended the use of ELISA for the detection of anti-*B. canis* antibodies in dogs, but variable results have been reported. Johnson and Walker (1992), using *B. canis* cell wall antigens, obtained equivalent specificity but lower sensitivity when compared with TAT. Mateu-de-Antonio et al. (1993) obtained 95.6% of specificity and 93.8% of sensitivity in an ELISA test using as antigen an extract prepared from a less mucoid variant of *B. canis*. Baldi et al. (1994, 1997), using as antigen a purified cytoplasmic protein (p18), and Letesson et al. (1997) using recombinant cytoplasmic proteins (p15, p17 and p39), all common proteins in the genus *Brucella*, reported sensitive and specific ELISAs for canine and cattle brucellosis, respectively.

In Brazil, the acidified antigen test (rose bengal), the 2 mercaptoethanol test and the complement fixation test (CFT) are currently used tests for the serodiagnosis of smooth *brucellae* (Brasil, 2001). The AGID test is the most widely used in routine serodiagnosis of rough *brucellae*. Presently there is only one commercially available AGID kit in the country, which uses a heat saline soluble *B. ovis* extract as antigen (Schlemper and Vaz, 1990; Keid et al., 2004). Agglutination tests using whole bacterial cells, AGID and ELISA tests with diverse antigen preparations, from cell fractions to recombinant proteins, have been the most quoted tests in reports worldwide for current serological diagnosis of the infection (Ebani et al., 2003; Lucero et al., 2005; Wanke, 2004; Wanke et al., 2006).

None of the referred serological methods are diagnostically conclusive, being the ELISA test still considered the most specific and sensitive. Furthermore, the use of an antigen, which is easy to prepare and capable to provide a test with good sensitivity and specificity, would improve surveillance studies of canine brucellosis. The test would allow as well the identification of potentially infected individuals. The present study describes the application of an antigen prepared from a *B. canis* which was isolated from an infected dog and used for the standardization of an indirect ELISA test.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and antigen preparation

A gram negative bacteria was isolated on blood agar (96 h incubation at 37 °C, with no CO₂ requirement), from the placenta and fetuses of a bitch with positive AGID test for *B. canis* that aborted between 42nd and 45th days of gestation (Vargas et al., 1996). The small non hemolytic colonies isolated presented a white-greyish color with a rough morphology as demonstrated by the purple color of the colonies after the plates being flooded with crystal violet dye (White and Wilson, 1951). No growth occurred on Mac Conkey agar. The organism gave positive results for catalase, oxidase, nitrate reduction, urease and negative results for citrate, Voges Proskauer and methyl red. No H₂S production or glucose utilization were observed. The bacteria agglutinated with anti-R sera and with acriflavin with no agglutination with anti-A or -M monospecific sera (Alton et al., 1988). Based on these results the bacterium was classified as *B. canis*.

For the antigen preparation, a heat soluble bacterial extract was obtained following the method described by Myers et al. (1972), with minor modifications. Briefly, the culture was transferred to 5 mL of Brucella Broth (BBL Microbiological Systems, Cockeysville, USA), cultured for 48 h at 37 °C, and expanded in Roux flasks containing 100 mL of Brucella Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) under aerobiosis, for 48 h at 37 °C, as described by Carmichael and Bruner (1968). Bacterial cells were harvested with 50 mL of sterile PBS (phosphate buffered saline; 150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 9 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, pH 7.4) and inactivated by heat (1 h, 56 °C). The suspension was filtered through sterile gauze and washed three times by centrifugation (3,500 × g, 10 min) in PBS. The pellet was then resuspended in 10 mL of PBS and autoclaved at 120 °C under 1.5 Atmospheres for 20 min. The cells were then centrifuged at 12000 × g for 20 min, at 4 °C. The supernatant, collected and stored in 200 µL aliquots at -20 °C, was used as the ELISA solid phase antigen. The protein concentration of the antigen was determined by the method of Lowry et al. (1951).

2.2. Sera

Twenty positive sera from animals with clinical signs, positive bacterial isolations and AGID-positive tests for brucellosis test were used as reference. Ten negative serum samples from adult healthy animals, obtained in a kennel with no history or evidences of canine brucellosis (such as reproductive disorders associated to fever, lymphadenopathy or other clinical signs) were tested negative by the AGID and used as negative reference. These reference sera were used for the calculation of specificity and sensitivity of the ELISA test. Twenty one samples from healthy 6 months old animals, kept in a research center were used

for calculation of the cut-off for the ELISA tests and as negative control sera for western blotting assays. These sera were kindly supplied by The Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ-Bahia). Two hundred and eighty (280) serum samples of unknown serology status for *B. canis* were obtained from serum banks of different research institutions. These 280 field sera were tested together with the reference sera in a double blind testing, for determination of the kappa values for concordance evaluation between the positive results obtained by ELISA and AGID.

2.3. Agar gel immunodiffusion test – AGID test

All sera were tested using a commercial kit (Tecpar-Brazil) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Indirect ELISA protocol

The indirect ELISA was standardized and performed as described elsewhere (Mateu-de-Antonio et al., 1993; Carpenter, 1997) with modifications. Optimum antigen concentration, as well as peroxidase-conjugated anti-dog immunoglobulin and sera dilutions were determined by serial titrations and incubations were performed in a humid chamber. Briefly, flat bottomed polystyrene 96-well microtiter plates (Corning Inc., New York, USA), were sensitized overnight at 4 °C with 50 µL/well of antigen, diluted to 5 µg/mL in 0.05 M sodium carbonate pH 9.6. The plates were washed five times with PBS containing 0.05% (v/v) Tween-20 (PBS-T). Each well of the antigen-coated plates were blocked with 200 µL of 5% skimmed milk in PBS-T and incubated at 37 °C for 1 h. After five washes, 100 µL of control and test sera samples, diluted 1:1000 in PBS-T containing 1% (v/v) of skimmed milk, were added to each well in duplicate. The plates were sealed and incubated at 37 °C for 1 h. After five washing cycles with PBS-T, 100 µL of anti-dog IgG conjugated with peroxidase (Sigma, St Louis, USA), at a dilution of 1:10 000 in PBS-T, were added to each well, and the plates incubated at 37 °C for 1 h. After five washings as described above, the color reaction was developed by adding 50 µL/well of a solution containing 1.0 mg/mL of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD; Sigma, St Louis, USA) in 0.05 M citrate buffer (pH 4.0) with 0.04% (v/v) H₂O₂. The plates were incubated in the dark for 15 min, at room temperature. Color development was halted by the addition of 25 µL/well of 4N H₂SO₄. The absorbance measurements were made at 492 nm, using an automatic ELISA plate reader (550, Bio-Rad, Life Sciences, Hercules, USA). Samples with an absorbance value equal to or higher than the cut-off value were considered as positives.

2.5. SDS-PAGE and Western blotting

The antigen was solubilized in sample buffer and subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% polyacrylamide gels

and analysed with Coomassie blue (2.5% brilliant blue in 50% methanol, 10% acetic acid) staining. For Western blotting, electrophoresed antigen was transferred to nitrocellulose membranes by using wet procedure. Unbound sites on the membranes were blocked with 5% skimmed milk in PBS-T, at 4 °C, by incubation overnight. The membranes were cut into 0.5 cm wide strips after being washed five times with PBS-T. Each of 20 positive and 20 negative control sera, diluted 1:100 in PBS-T with 1% of skimmed milk were added to individual strips, which were incubated at 37 °C for 1 h. Following, the strips were washed five times with PBS-T and blots developed with peroxidase labeled anti-dog IgG (Sigma, St Louis, USA), diluted at 1:500 in PBS-T, during 1 h at 37 °C. After five washing steps, the strips were immersed in a substrate solution, made by a 1:5 dilution of a 0.3% 4-Cl- α -naphthol in methanol and Tris-saline buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 7.2), with 0.04% (v/v) H₂O₂, and the reaction developed in darkness, at room temperature, for 10–15 min. A last washing step was performed once with distilled water.

2.6. Test performance determinations and statistical analysis

The cut-off value was calculated in according to a mathematical method as described by Frey et al. (1998), which takes in consideration the upper tail of the *t*-distribution of negative control sera readings, as expressed in the following equation

$$\text{Cut-off} = X + SDf \quad (1)$$

where *X* is the mean of independent sera readings and *SD* is the standard deviation, whose calculations were performed using Prism[®] software (GraphPad Software Inc.). The factor *f* is based on the number of negative controls and the confidence level (1 – α). The value of *f* used for calculation of the cut-off point in this study was of 2.932, and corresponded to the desired confidence level of 99.5% ($\alpha = 0.005$) and the sample size of 21 controls, since the sera of 21 healthy young dogs were used for this purpose (Frey et al., 1998).

Assay-to-assay variation was corrected for statistical analysis, in accordance with Zwirner (1996). The corrected OD (COD) of each serum sample was calculated by multiplying its mean OD value of readings by the correction factor (CF) between plates, as determined by the following equation:

$$\text{COD} = \text{OD} \cdot \text{CF} \quad (2)$$

where $\text{CF} = \frac{\text{Mean OD of the positive control sera from a reference plate}}{\text{Mean OD of the positive control sera from plate of the assay}}$.

To calculate the ELISA specificity and the sensitivity, 20 positive and 10 negative ELISA reference sera were analyzed in comparison with the same sera's reactivity by the AGID test. The following Eqs. (3) and (4) were applied, as described by Ferreira and Avila (1996)

$$\text{Specificity} = \frac{\text{True negative sera}}{\text{True negative sera} + \text{False positive sera}} \quad (3)$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{True positive sera}}{\text{True positive sera} + \text{False negative sera}} \quad (4)$$

The results obtained by the indirect ELISA were compared with those obtained by AGID test using known reference and field samples of unknown serologic status. The reduced difference statistical test was used for comparison of the proportion of positive results between tests (Schwartz, 1987). The kappa index of concordance between methods was determined by testing 20 positive and 10 negative control sera, and the 280 sera from field, in double-blind tests (Armitage and Berry, 1994). Mean and standard deviation (SD) of corrected OD reading values of all sera were used for ROC Curve analysis (Griner et al., 1981).

3. Results

3.1. *B. Canis* antigen and standardization of the ELISA

Each Roux flask containing a *B. canis* culture yielded approximately 30 mg of bacterial extract, as determined by Lowry's method for protein quantitation. This antigen preparation showed a complex electrophoretic profile with various bands in the SDS-PAGE Coomassie blue-stained gel (Fig. 1). The Western immunoblotting analysis of the antigen using positive and negative reference sera showed a pattern of band recognition more consistently for polypeptides of 12, 18, 58 and 65 KDa, as represented in Fig 2.

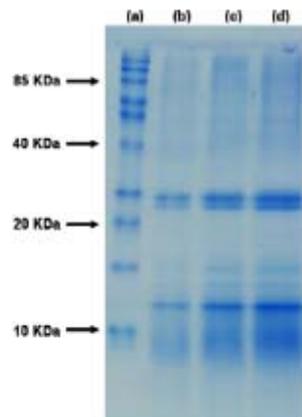


Fig. 1. Profile of *B. canis* antigen preparation in three different dilutions (lanes b, c and d) on a Coomassie blue-stained SDS-PAGE. Lane (a) contains the benchmark pre-stained protein ladder for molecular weight (Invitrogen) as indicated by numbers on the left.

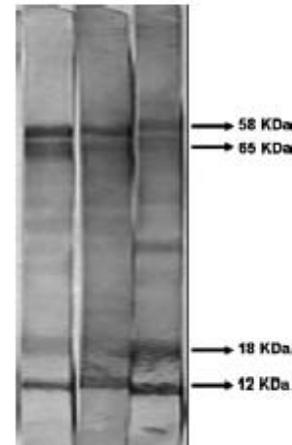


Fig. 2. Representative profile of the more consistently recognized bands by positive sera of *B. canis* antigen preparation on nitrocellulose immunoblot. The numbers to the right indicate the molecular weight of the protein bands.

In order to determine the optimum concentration of antigen to be adsorbed to microtiter plates, previous assays were performed, using from 1 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.05 M sodium carbonate pH 9.6. Best results were obtained with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of bacterial extract in 50 μL (250 ng) of solution in each well. By serial titrations of positive control sera and peroxidase-conjugated anti-dog IgG antibody, the optimal dilutions for the indirect ELISA were established as being respectively 1:1000 and 1:10 000. The cut-off OD value, as determined by sera samples from 21 healthy 6 months old dogs, was 0.218.

3.2. Analysis of field sera by the indirect ELISA

A double-blind testing, performed with the indirect ELISA test, included 280 field sera from dogs with unknown history of brucellosis, the 30 reference positive and negative sera, and the 21 serum samples from young healthy dogs, totalizing 331 samples. In this study, it was found that 72 sera samples (26%) presented OD values above the cut-off, and were positive to ELISA. The OD values for the positive samples ranged from 0.218 to 1.115 (mean = 0.466; SD = 0.238) and for the negative samples ranged from 0.046 to 0.217 (mean = 0.108; SD = 0.042). The ratio between the OD value from the highest positive serum and the mean OD of the negative control sera was 10.32 (1.115/0.108), and was calculated according to Mateu-de-Antonio et al. (1993) and Baldi et al. (1994). The distribution of the OD frequencies among the field sera are shown in Fig. 3.

The sensitivity and the specificity of the indirect ELISA, determined by the comparative testing of positive and negative by the AGID, was of 95% and 91%, respectively.

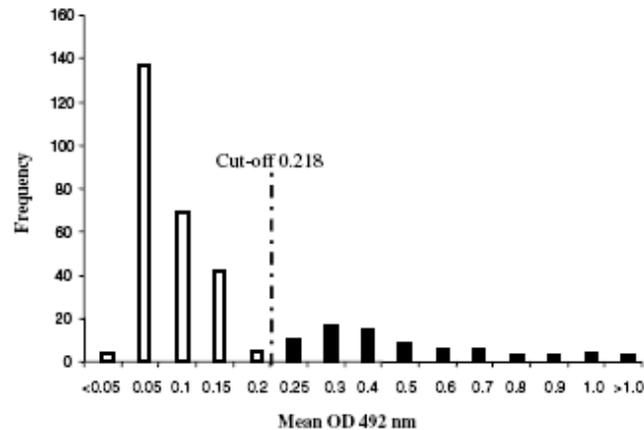


Fig. 3. Frequency distribution of the mean OD values of positive (■) and negative (□) canine field sera by indirect ELISA for detection of antibody against *Brucella canis*. All sera that had an OD above 0.218 (cut-off) were considered to be positive.

Assay-to-assay variation, as determined by each plate correction factor for repeated assays using the same 30 control sera, was 17%.

The ability to distinguish positive and negative sera to *B. canis* antigens by detection of antibody reactivity by AGID and by indirect ELISA was compared. These results were used to calculate the sensitivity, the specificity and the Kappa index of concordance between tests. The correlation between the ELISA and the AGID was highly significant, as expressed by the Kappa index of 0.84. The reduced difference test ($\epsilon = 1.64$; $p < 0.05$) also showed a significant test agreement.

The overall diagnostic accuracy of the ELISA test was also evaluated by the ROC curve (receiver operating characteristics-SPSS) analysis, applied to the 280 field sera, using as standard references the absorbance values of the positive and negative control sera. For the selected cut-off value of 0.218, the ELISA test had both, specificity and sensitivity of 100%.

4. Discussion

In this study, we describe the development and evaluation of an indirect ELISA for the serodiagnosis of canine brucellosis. A bacterial whole cell extract was used as solid-phase antigen and sera from culture positive and healthy negative animals used as reference controls. In the double-blind analysis of the reactivity of canine field sera to *B. canis* antigens, the ELISA allowed a clear separation between positive and negative samples. In addition to the relatively good degree of agreement between ELISA and AGID, the results indicate that the ELISA is a specific and sensitive test for detection of anti-*Brucella* antibodies in canine sera.

The procedure used in the present work for obtaining the antigen preparation was based on the technique

described by Myers et al. (1972), with some modifications. This technique may have accounted for the maintenance of some intact outer membrane proteins (OMPs) as well as cytosolic proteins, which are highly specific for the genus *Brucella* (Cloekaert et al., 1990; Kittelberger et al., 1998; Wanke et al., 2002). Among four protein bands identified more consistently by *B. canis* positive sera by Western blotting in the present study, two low-molecular-weight bands, of 12 and 18 kDa, could be of particular interest for further studies. A cytoplasmic 18 kDa molecular weight *Brucella* protein has been identified previously as lumazine synthase and described as being highly antigenic in serological tests for canine brucellosis (Baldi et al., 1994, 1997; Goldbaun et al., 1999). On the other hand, low molecular mass protein fractions of *Brucella* outer membrane proteins are responsible for conferring good sensitivity in serological tests for diagnosis of recent infection (Cloekaert et al., 1990; Wanke et al., 2002; Lopez et al., 2005). These features of the antigen preparation may explain the good sensitivity achieved by the ELISA test in our study, since the technique used to extract antigen from bacteria may influence the primary structure of the molecules and have an important role in its function.

Among various criteria reported for selecting negative serum groups used for determining the cut-off value, the serum collected from healthy dogs, before their puberty, under 6 months of age, was chosen. This criterion was based on the literature, which shows a higher probability of brucellosis be present in animals at reproductive ages than in ages before reproductive activity (Moore and Gupta, 1970; Camichael and Joubert, 1988). The analysis of positive and negative sera provided by research institutions, as well as the use of field samples, made possible the comparative evaluation between the AGID test and the indirect ELISA.

Author's personal copy

The ELISA is a test that has the advantage of reducing interference of possible human errors and provides objective and readily measurable results due to the use of cut-off value and internal controls (Baldi et al., 1994; Troy et al., 1996). Despite the reduced overall sensitivity and specificity reported for the AGID test (Zwirner, 1996), the method was selected for comparison with the indirect ELISA test developed in the present study, because it is the official test for serological diagnosis of canine brucellosis in Brazil.

In terms of general sensitivity, ELISA techniques are superior to other tests, namely agglutination and AGID, commonly used for the serological diagnosis of *Brucella* infection (Johnson and Walker, 1992; Wanke et al., 2002; Wanke, 2004). High specificity and the capacity of detecting low levels of antibodies can be achieved with good antigen preparations, as shown by the results of the present study, in which the standardization of the indirect ELISA test was performed with sera dilutions of 1:1000. The agreement between AGID and ELISA was significant, as determined by the Kappa index of concordance of 0.84 between tests. The ELISA test specificity was of 91% and its sensitivity was of 95%. As the AGID results were taken as comparative standards, it is possible that these indexes of sensitivity and specificity may be underestimated. In fact, the ROC curve analysis of the test as it was performed showed 100% indexes for sensitivity and specificity. Studies regarding the reproducibility of the indirect ELISA are currently being carried out.

Despite the incidence of human infection by *B. canis* is not actually known (Wanke, 2004), the potential exposure to the bacteria represents a risk, particularly for laboratory or kennel workers, as well as dog owners, as reported elsewhere (Godoy et al., 1977; Carmichael and Shin, 1996; Lucero et al., 2005). It rises the need for efficient and inexpensive tests, which are appropriate for use in disease control programs of public health, particularly in developing countries. The antigen preparation and its application in an indirect ELISA, as described in the present study, were found to be feasible, simple to prepare and of low cost. The bacteria used for antigen preparation were obtained from a *B. canis* culture, isolated from a local infected animal. In spite of efficient ELISA tests being described elsewhere (Mateu-de-Antonio et al., 1993; Baldi et al., 1994, 1997; Wanke et al., 2002), it must be emphasized that laboratory procedures for antigen purification, that can improve the quality of immunological tests, may require expensive reagents and technology. This aspect can be restrictive for a number of developing countries.

Taking into account the advantages of the indirect ELISA described herein, it can be concluded that the test might be sufficiently accurate to be recommended as a serological test for either, field sera screening or confirmation of clinical canine brucellosis. The assay, for detecting antibodies against *B. canis* antigens, may complement or offer an alternative to the available tools for diagnose the disease.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Prof. Thereza Martinez for assistance with bacterial techniques and Prof. Thereza Calmon for statistical counseling. We are also indebted to Dr. Moacir Paranhos (CPqGM-FIOCRUZ-BA), Dr. Carlos Chávez Olortegui (FUNED-MG), the Laboratório de Doenças Tropicais (HUPES-UFBA) and the Centro de Controle de Zoonoses–Prefeitura de São Paulo for providing the canine serum samples. This work was financially supported by the Brazilian National Council for Research and Technological Development (CNPq).

References

- Alton, J.J., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris.
- Armitage, P., Berry, G., 1994. Statistical Methods in Medical Research, third ed. Blackwell Science, New York, p. 923.
- Baldi, P.C., Wanke, M.M., Loza, M.E., Fossati, C.A., 1994. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. Vet. Microbiol. 41, 127–134.
- Baldi, P.C., Wanke, M.M., Loza, M.E., Monachesi, N., Fossati, C.A., 1997. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. Vet. Microbiol. 51, 273–281.
- Berthelot, X., Garin-Bastuji, B., 1993. Brucellosis canines. Le Point Veterinaire 25, 125–129.
- Brasil, 2001. Departamento de Defesa Animal. Informações sobre o PNCBET. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil. <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>.
- Carmichael, L.E., 1966. Abortion in 200 Beagles. JAVMA 149, 1126–1166.
- Carmichael, L.E., Bruner, D.W., 1968. Characterization of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. Cornell Vet. 58, 579–592.
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., 1988. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. Cornell Vet. 78, 63–73.
- Carmichael, L.E., Shin, S.J., 1996. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal) 11, 161–165.
- Carpenter, A.B., 1997. Enzyme-linked immunoassays. In: ROSE, N.R. (Ed.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, fifth ed. ASM Press, Washington DC, pp. 20–29.
- Cloekaert, A., deWergifosse, P., Dubray, G., Limet, J.N., 1990. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. Infect. Immun. 58, 3980–3987.
- Ebani, V.V., Cerri, D., Fratini, F., Bey, R.F., Andreani, E., 2003. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. New Microbiol. 26, 65–73.
- Ferreira, W., Ávila, S.L.M., 1996. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 302.
- Frey, A., Canzio, J.D., Zurakowski, D., 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. J. Immunol. Method 221, 35–41.
- Godoy, A.M., Peres, J.N., Barg, L., 1977. Isolamento de *Brucella canis* em Minas Gerais Brasil. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais 29, 35–42.
- Goldbaum, F.A., Velikovsky, C.A., Baldi, P.C., Mortl, S., Bacher, A., Fossati, C.A., 1999. The 18-kDa cytoplasmic protein of *Brucella*

- species – an antigen useful for diagnosis – is a lumazine synthase. *J. Med. Microbiol.* 48, 833–839.
- Griner, P.F., Mayewski, R.J., Mushlin, A.I., Greenland, P., 1981. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Ann. Intern. Med.* 94, 555–600.
- Johnson, C.A., Walker, R.D., 1992. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Comp. Cont. Educ.* 14, 763–772.
- Keid, L.B., Soares, R.M., Morais, Z.M., Richtzenhain, L.J., Vasconcellos, S.A., 2004. *Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 35, 161–166.
- Kittelberger, R., Diack, D.S., Vízcaíno, N., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., 1998. Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 59, 213–227.
- Letesson, J.J., Tibor, A., Eynde, G., Wansard, V., Weynants, V., Denoel, P., Saman, E., 1997. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 4, 556–564.
- Lopez, G., Ayala, S.M., Escobar, G.L., Lucero, N.E., 2005. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 105, 181–187.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lucero, N.E., Escobar, G.L., Ayala, S.M., Lopez, G., 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J. Med. Microbiol.* 51, 656–660.
- Lucero, N.E., Escobar, G.L., Ayala, S.M., Jacob, N., 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J. Med. Microbiol.* 54, 457–461.
- Mateu-de-António, E.M., Martín, M., Soler, M., 1993. Use of indirect enzyme-linked assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1043–1046.
- Moore, J.A., Gupta, B.N., 1970. Epizootiology, diagnosis and control of *Brucella canis*. *JAVMA* 156, 1737–1740.
- Myers, D.M., Jones, L.M., Varela-Díaz, V.M., 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucellae*. *Appl. Microbiol.* 23, 894–902.
- Myers, D.M., Varela-Díaz, V.M., 1980. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. *Cornell Vet.* 70, 258–265.
- Schwartz, D., 1987. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*, 10 ed. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp. 218–223.
- Schlemper, S.R.M., Vaz, A.K., 1990. Inquérito sorológico para brucelose canina por *Brucella canis* na região do planalto catarinense – Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 12, 8–12.
- Serikawa, T., Iwaki, S., Mori, M., 1989. Purification of *Brucella canis* cell wall antigen using immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 27, 837–842.
- Troy, G.C., Becker, M.J., Greene, R.T., 1996. Proficiency testing of selected antigen and antibody tests for use in dogs and cats. *JAVMA* 209, 914–917.
- Vargas, A.C., Lazzari, A., Dutra, V., Poester, F.P., 1996. Brucelose canina: Relato de caso. *Ciência Veterinária* 26, 305–308.
- Wanke, M.M., 2004. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 195–207.
- Wanke, M.M., Delpino, M.V., Baldi, P.C., 2002. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 88, 367–375.
- Wanke, M.M., Delpino, M.V., Baldi, P.C., 2006. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). *Theriogenology* 66, 1573–1578.
- White, P.G., Wilson, J.B., 1951. Differentiation of smooth and non-smooth colonies of brucellae. *J. Bacteriol.* 61, 239–240.
- Zwimer, N.W., 1996. ELISA. In: Margni, R.A. *Imunologia e Imunoquímica*, fifth ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires; pp. 798–820.