



  **Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale

Documento tecnico.

Brucellosi canina da *Brucella canis*: descrizione della malattia e delle modalità di controllo

Revisione 0
10 luglio 2020

Centro di Referenza Nazionale per le Brucellosi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
Campo Boario - 64100 Teramo
telefono 0861 3321 fax 0861 332251 www.izs.it



Indice

1. INTRODUZIONE.....	34
2. DECRIZIONE DELLA MALATTIA	34
2.1 Eziologia	34
2.2 Epidemiologia.....	34
2.2.1. <i>Distribuzione geografica</i>	34
2.2.2. <i>Specie recettive</i>	45
2.2.3. <i>Modalità di Trasmissione</i>	45
2.3 Patogenesi e lesioni anatomo-patologiche	56
2.4 Sintomatologia	67
3. DIAGNOSI	78
3.1. Diagnosi clinica	78
3.2. Diagnosi di laboratorio.....	89
3.2.1. <i>Metodi diretti</i>	89
3.2.1.1 Isolamento.....	89
3.2.1.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	910
3.2.2. <i>Metodi indiretti</i>	1011
3.2.2.1 Test di agglutinazione rapida su vetrino (RSAT e 2ME-RSAT).....	1213
3.2.2.2. Test di agglutinazione in provetta (TAT)	1213
3.2.2.3. Test di immunodiffusione in gel di agar (AGID).....	1314
3.2.2.4. Test di immunofluorescenza indiretta (IFA)	1314
3.2.2.5. Test immunoenzimatico (ELISA)	1314
3.2.2.5. Test di fissazione del complemento (CFT).....	1314
3.2.2.6. Interpretazione dei test diagnostici.....	1415
4. TERAPIA	1415
5. PROFILASSI	1516
5.1. Profilassi indiretta	1516
5.2. Profilassi diretta	1516
5.2.1. <i>Gestione degli allevamenti indenni e prevenzione della diffusione tra gli allevamenti</i>	1516
5.2.2. <i>Gestione degli allevamenti infetti</i>	1617
6. ASPETTI DI SANITA' PUBBLICA	1920
7. BIBLIOGRAFIA.....	2122
ALLEGATO 1. PROPOSTA DI ALGORITMO DIAGNOSTICO DA UTILIZZARE IN ALLEVAMENTI CANINI INFETTI DA <i>B. CANIS</i>.	2627

1. INTRODUZIONE

La brucellosi è una malattia infettiva contagiosa sostenuta da batteri del genere *Brucella*, che può colpire varie specie animali. Per quanto riguarda il cane, questo può essere occasionalmente infettato da *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*, oppure essere interessato dalla forma endemica della malattia, sostenuta da *B. canis*. Tra le brucellosi che interessano gli animali domestici, quella del cane è senz'altro la meno frequente, ma è anche la meno studiata.

La brucellosi canina da *B. abortus* e *B. melitensis* viene diagnosticata in maniera sporadica nei cani che vivono a contatto con ruminanti infetti, ma in questi casi essa rappresenta solamente un epifenomeno dell'infezione brucellare propria dell'allevamento colpito e il cane non svolge il ruolo di serbatoio della malattia. Lo stesso discorso vale per la brucellosi canina da *B. suis*, identificata peraltro raramente nel cane e comunque sempre in correlazione ad una concomitante infezione in allevamenti suini.

La brucellosi canina da *B. canis* invece rappresenta la brucellosi specifica del cane, sia in quanto esso ne è la principale specie animale recettiva, sia in virtù del fatto che ne costituisce il serbatoio d'infezione fondamentale. Nel presente documento, pertanto, si intenderà per brucellosi canina la malattia sostenuta nel cane da *B. canis*.

La malattia può interessare anche l'uomo, sebbene il suo decorso non assuma le caratteristiche di gravità tipiche dell'infezione brucellare determinata dalle specie "classiche" del genere *Brucella*; ad ogni modo nei Paesi in cui la malattia è presente (in particolare nel continente americano) essa è considerata un'autentica zoonosi.

Poiché in Italia sono frequenti le importazioni di cani da nazioni in cui la malattia è presente, spesso con movimenti indiscriminati e privi di controllo sanitario, e in considerazione del fatto che le potenzialità zoonosiche della malattia possono essere favorite dalla stretta coabitazione tra uomo e cane, che si realizza in special modo negli ambienti urbani, è necessario considerare la brucellosi canina come una problematica di sanità pubblica suscettibile di introduzione e diffusione nel territorio italiano.

2. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

2.1 Eziologia

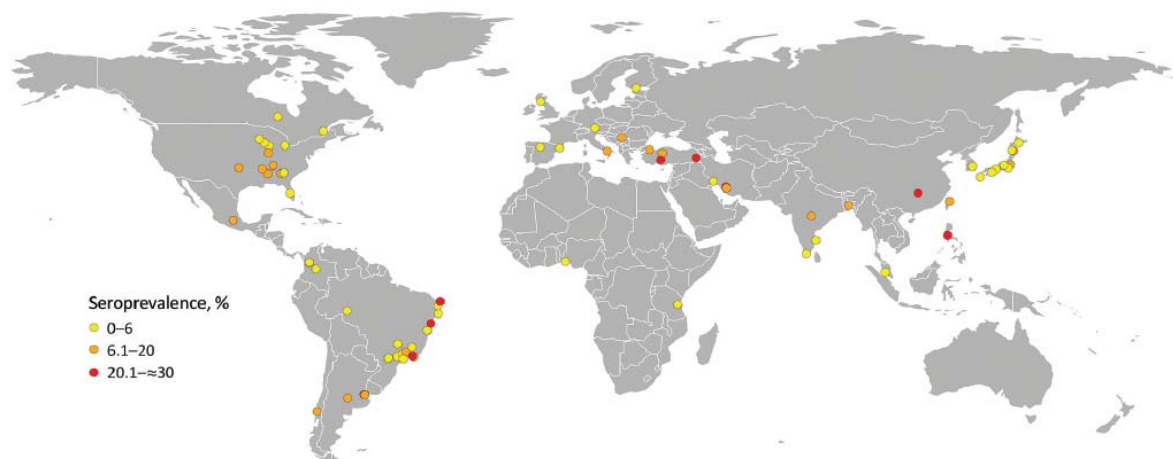
Il genere *Brucella* è costituito da cocchi, coccobacilli di 0,5-0,7 μm di diametro e 0,6-1,5 μm di lunghezza, disposti singolarmente o, meno frequentemente, in coppie, corte catene o piccoli gruppi. Sono germi immobili (non producono flagelli), aerobi, Gram negativi e asporigeni. In particolare, *B. canis* non presenta biovar, non richiede anidride carbonica per crescere in primo isolamento, cresce su terreno con tionina e non con fucsina basica. In primo isolamento le colonie di *B. canis* si presentano sempre in fase R (rugosa) o M (mucoide), mentre non ne è stata mai riscontrata l'esistenza in fase S (liscia). Le colture di *B. canis* non agglutinano in presenza di antisieri monospecifici verso gli antigeni A e M, mentre agglutinano con antisieri specifici verso l'antigene R di *B. ovis*. Sono possibili inoltre reazioni crociate con antigeni di superficie di altre specie del genere *Brucella* in fase non liscia. *B. canis* non produce H_2S , non ossida il substrato a base di L-Asparagina o D-Xilosio, non riduce i nitrati a nitriti, non mostra lisi nella reazione con i diversi fagi, tranne che col fago R/C (Corbel e Brinkley-Morgan, 1989).

2.2 Epidemiologia

2.2.1. Distribuzione geografica

B. canis è stata evidenziata per la prima volta nel 1966 durante lo studio di diversi focolai di aborto e infertilità nella specie canina verificatisi in diverse aree degli Stati Uniti d'America (Carmichael, 1966). Successivamente, l'infezione da *B. canis* è stata dimostrata in vari Paesi del mondo a seguito dell'isolamento dell'agente eziologico, mentre in altri la sua presenza è stata sospettata sulla base del reperimento di positività sierologiche. Hensel *et al.* (2018) hanno recentemente raccolto le informazioni presenti nella letteratura internazionale relative alle indagini sierologiche svolte sulla brucellosi canina da *B. canis* a livello mondiale (Figura 1). Tali studi dimostrano come ci sia un ampio livello di variabilità nella positività sierologica (dall'1% al 28%) in relazione alla nazione studiata e al campione prelevato (Hensel *et al.*, 2018).

Figura 1. Localizzazione ed esito delle indagini sierologiche per il rilievo di anticorpi contro *B. canis* presenti nella letteratura scientifica internazionale. Ciascun punto rappresenta uno studio pubblicato, il colore del punto rappresenta la sieroprevalenza individuata (Da Hensel *et al.*, 2018).



La determinazione della sieroprevalenza è fortemente influenzata dal tipo di test sierologico usato e dall'interpretazione dei relativi risultati, a causa del fatto che *B. canis* condivide determinanti antigenici con tutte le brucelle in fase R (rugosa), così come ne condivide con microrganismi di altri generi non correlati al genere *Brucella* (Carmichael, 1990). Inoltre, l'ampio livello di sieroprevalenza registrato potrebbe essere attribuito anche ad altri fattori, quali la reale prevalenza della malattia nell'area oggetto di studio, le modalità di campionamento e l'algoritmo utilizzato per l'interpretazione dei test diagnostici (Hensel *et al.*, 2018).

In Italia fino ad oggi la *B. canis* non è mai stata isolata. Numerose indagini volte ad accertarne la presenza riportano il rilievo di positività sierologiche a vari livelli in diverse realtà geografiche (Tolari e Pizzirani, 1978; Colella *et al.*, 1980; Ciuchini *et al.*, 1982; Vesco *et al.*, 1987; Valente *et al.*, 1991; Buonavoglia *et al.*, 1992; Prosperi *et al.*, 1994; Casalnuovo *et al.*, 1996). L'unico caso descritto in letteratura scientifica di identificazione e di osservazione clinica risale al 2008, quando Corrente *et al.* (2010) rilevarono tramite PCR *B. canis* in un cane meticcio affetto da prostatite cronica e da discospondilite.

2.2.2. Specie recettive

A differenza delle brucelle in fase S (liscia), che sono in grado di infettare diverse specie di animali domestici, la *B. canis* possiede un numero limitato di possibili ospiti. Infatti solo il cane e i canidi selvatici sono stati riconosciuti come specie naturalmente sensibili a tale infezione, mentre bovini, ovi-caprini e suini sono altamente resistenti. I gatti appaiono moderatamente sensibili e, a seguito di esposizione orale alla *B. canis*, sviluppano batteriemia con bassi titoli anticorpali. Anche cavie, topi, ratti e primati non umani sono sensibili all'infezione sperimentale. (Carmichael, 1990). Il coniglio è più sensibile delle altre specie di laboratorio, sviluppando orchiti e ascessi peritoneali a seguito di inoculazione intraperitoneale di dosi elevate (Carmichael e Bruner, 1968).

L'uomo può acquisire l'infezione da *B. canis* attraverso il contatto diretto con cani infetti, con le relative secrezioni della sfera riproduttiva, o col loro sangue (Lawaczek *et al.*, 2011; Lucero *et al.*, 2010) e può sviluppare malattia clinica.

2.2.3. Modalità di Trasmissione

La brucellosi canina da *B. canis* è frequente soprattutto fra i cani randagi, nei canili, negli allevamenti o comunque nei luoghi in cui i cani sono mantenuti in gruppi numerosi (Carmichael e Joubert, 1988). Quando la malattia è introdotta in un canile la diffusione è rapida (Carmichael e Bruner, 1968). È stato dimostrato che *B. canis* può essere trasmessa da maschi adulti infetti a maschi adulti sani dopo alcune

settimane o alcuni mesi di coabitazione è altresì stato dimostrato che non si trasmette tra maschi o femmine non sessualmente maturi (Carmichael e Joubert, 1988).

Le vie naturali di trasmissione della brucellosi canina sono numerose, ma la più comune è costituita dal contatto con placenta, tessuti fetali e scoli vaginali conseguenti ad aborto. I soggetti infetti di sesso femminile trasmettono *B. canis* attraverso placenta, feto infetto abortito o scoli vaginali susseguenti all'aborto mediante contatto con le mucose dell'organismo ospite; la trasmissione inoltre è possibile anche durante l'estro o l'accoppiamento (Carmichael, 1990). Lo scolo vaginale può contenere un numero di microrganismi superiore a 10^{10} per ml e l'eliminazione attraverso tale via può continuare per numerose settimane dall'aborto (Carmichael e Joubert, 1988). Altre secrezioni corporee contengono concentrazioni più basse di *B. canis* e sono meno importanti per la diffusione dell'infezione.

La maggior parte dei cuccioli si infetta nell'utero ma, allo stesso tempo, le madri infette o il loro latte rappresentano una potenziale fonte di infezione per quelli che sopravvivono.

Il liquido seminale e le urine di cani che albergano l'organismo nella prostata e nell'epididimo sono stati identificati come un'importante fonte di diffusione della malattia. Durante le prime 6-8 settimane di infezione, la concentrazione di *B. canis* isolata da seme di maschi infetti è elevata; è stata osservata inoltre l'eliminazione del microrganismo in basse concentrazioni per un periodo che supera le 60 settimane (George *et al.*, 1979). In condizioni sperimentali è stato possibile rilevare che l'isolamento di *B. canis* da prostata ed epididimo è possibile anche oltre i due mesi dalla cessazione della batteriemia e che la trasmissione venerea della malattia può continuare per almeno due anni in cani che appaiono clinicamente normali. Anche a seguito di castrazione, i maschi possono rimanere fonte d'infezione per il fatto che il batterio può persistere nei tessuti prostatici e linfatici (Carmichael, 2012).

Oltre alle secrezioni legate alla sfera riproduttiva, i cani possono eliminare il batterio nella saliva, nelle secrezioni nasali e tramite le urine (Carmichael e Joubert, 1988; Moore, 1969).

L'eliminazione urinaria comincia poche settimane dopo l'inizio della batteriemia e continua per almeno tre mesi. Nelle urine dei soggetti maschi infetti sono state riscontrate concentrazioni di microrganismi da 10^3 a 10^6 per millilitro, mentre per le femmine tale numero è inferiore (Serikawa e Muraguchi, 1979). A differenza di quel che accade per il maschio, sembra che nelle femmine le urine non rivestano importanza per la trasmissione della malattia, a causa del basso numero di microrganismi in esse presenti (Carmichael, 1990). Il fatto che il maschio elimini il microrganismo con le urine in maggiore quantità è probabilmente correlato alla specifica localizzazione della *B. canis* nella prostata e nell'epididimo o alla contaminazione con liquido seminale (Carmichael e Joubert, 1988). Tuttavia, il ruolo delle urine come mezzo di trasmissione della brucellosi canina da *B. canis* ancora non è stato completamente chiarito (Hensel *et al.*, 2018).

2.3 Patogenesi e lesioni anatomo-patologiche

Sebbene la patogenesi dell'infezione da *B. canis* non sia stata ancora studiata in maniera esaustiva, tuttavia essa segue con tutta probabilità il modello generale di infezione brucellare comune alle altre specie animali. L'agente eziologico può penetrare attraverso le mucose congiuntivali, orali e dell'apparato genitale (Carmichael, 1990). Nel cane la dose minima infettante per via orale si aggira intorno a 2×10^6 Unità Formanti Colonia (UFC), mentre la dose minima infettante per via venerea non è stata determinata, anche se si presume sia di poco inferiore (Carmichael e Joubert, 1988). La dose infettante per via congiuntivale è inferiore, aggirandosi tra 10^4 e 10^5 UFC (Serikawa e Muraguchi, 1979).

A seguito di infezione attraverso le mucose orali il periodo di incubazione è variabile, tuttavia normalmente si può rilevare una batteriemia associata ai leucociti dopo una o due settimane dall'infezione (Carmichael e Joubert, 1988).

Una caratteristica della malattia, significativa anche dal punto di vista diagnostico, è la prolungata batteriemia, durante la quale comunemente, a partire da un mese dall'avvenuta infezione, è possibile riscontrare nel sangue la presenza di un numero di batteri anche superiore a 10^3 per ml. La batteriemia può durare anche solamente sei mesi, tuttavia essa comunemente persiste per almeno uno o due anni ed è stata osservata in alcuni casi anche per un periodo pari a cinque anni (Carmichael *et al.*, 1984). La batteriemia, costante nella fase acuta della malattia, diviene intermittente nella fase cronica (Alton *et al.*, 1988). Al termine della batteriemia, *B. canis* può essere isolata per parecchi mesi in milza, linfonodi, midollo osseo, prostata ed epididimo (Carmichael, 1990).

Non sono state descritte lesioni anatomo-patologiche specifiche di infezione da *B. canis*; le alterazioni macroscopiche rilevabili nei soggetti adulti infetti o nei cuccioli infetti sopravvissuti sono normalmente limitate ad una ipertrofia linfonodale e a splenomegalia, mentre le lesioni osservate a carico dell'apparato genitale sono rappresentate da classiche lesioni di infiammazione acuta o cronica (Carmichael, 1990). Dal punto di vista microscopico si denota una iperplasia linforeticolare diffusa che interessa tutti gli organi linfoidi e che costituisce una alterazione costante sia in presenza che in assenza di batteriemia (Serikawa e Muraguchi, 1979). In corso di batteriemia cronica i seni linfonodali e splenici mostrano infiltrazione di plasmacellule e di macrofagi contenenti batteri fagocitati. In tutti gli organi dell'apparato urogenitale è presente infiltrazione linfocitica diffusa al livello di sottomucosa, che interessa principalmente prostata, epididimo, pelvi renale e utero (Carmichael, 2012). Nei soggetti infetti in maniera cronica è frequente rilevare endometrite subacuta o cronica, prostatite granulomatosa, atrofia e fibrosi testicolare. Altre lesioni possono interessare il rene con addensamenti ialini della membrana basale del glomerulo con scarsa infiltrazione cellulare. Altre alterazioni descritte comprendono necrosi focali epatiche, miocarditi e meningoencefaliti (Carmichael, 1990). Le alterazioni a livello dell'occhio sono rappresentate da iridociclite granulomatosa e retinite essudativa, caratterizzate da diffusa infiltrazione di linfociti, plasmacellule e neutrofili (Saegusa *et al.*, 1978). I feti abortiti mostrano edema sottocutaneo, congestione ed emorragie nel sottocute della regione addominale (Carmichael, 2012). L'esame anatomopatologico degli annessi placentari pone in evidenza focolai di necrosi coagulativa a carico dei villi coriali ed un gran numero di batteri all'interno delle cellule trofoblastiche epiteliali (Feldman e Nelson, 1996).

2.4 Sintomatologia

Nonostante l'infezione da *B. canis* abbia carattere sistemico, i cani adulti infetti raramente mostrano sintomi particolarmente evidenti (Carmichael, 1990). La malattia, a parte rari casi, evolve in assenza di febbre (Carmichael e Bruner, 1968). Non ci sono sintomi patognomonicamente (Hensel *et al.*, 2018).

Un sintomo comune sia ai soggetti maschi che alle femmine è un aumento di volume linfonodale monolaterale o bilaterale nelle sedi di penetrazione (generalmente linfonodi retrofaringei per la via orale e linfonodi iliaci esterni ed inguinali superficiali per la via vaginale). Tale linfadenopatia costituisce l'unico sintomo rilevabile nella femmina adulta non gravida, mentre nel maschio adulto possono aggiungersi prostatite ed epididimite.

Nelle femmine gravide il sintomo principale è l'aborto tardivo, che generalmente si verifica tra il 45° e il 55° giorno di gestazione (Carmichael, 2012). L'aborto è seguito da uno scolo vaginale privo di odori di colore dal giallo al marrone che persiste per un periodo che va da una a sei settimane (Carmichael, 1968).

Sono stati descritti anche casi di riassorbimento embrionale oppure di aborto dal decimo al ventesimo giorno dall'accoppiamento, che il più delle volte nella pratica passano inosservati poiché vengono considerati come accoppiamenti infecondi (Carmichael, 1990).

In casi eccezionali, la gravidanza può essere portata a termine con la nascita allo stesso tempo sia di cuccioli vivi che di cuccioli morti (Feldman e Nelson, 1996). La maggior parte dei cuccioli nati vivi muoiono nel giro di poche ore o di pochi giorni, quelli che sopravvivono mostrano normalmente un aumento generalizzato del volume linfonodale, che costituisce il sintomo principale finché essi non raggiungono la maturità sessuale (Carmichael, 1990). Tali cuccioli possono essere batteriemici ma apparentemente sani (Carmichael, 2012). In aggiunta, come manifestazione sistemica della infezione da *B. canis*, i cuccioli sopravvissuti normalmente mostrano una iperglobulinemia persistente e qualcuno di essi può presentare febbre transitoria, leucocitosi o convulsioni (Carmichael, 2012). È possibile che cuccioli apparentemente sani nati da madri infette diffondano *B. canis* ad altri cani e all'uomo (Dentinger *et al.*, 2012).

Così come accade nelle brucellosi che interessano le altre specie animali, anche nel cane l'infezione da *B. canis* non interferisce con il normale ciclo estrale. Si è riscontrato infatti che più dell'85% delle femmine che hanno abortito a seguito dell'infezione da *B. canis* può avere in seguito gestazioni normali con parti regolari, mentre la restante parte può andare incontro ancora a problemi riproduttivi, che possono manifestarsi anche in maniera intermittente. Più raramente, le femmine infette possono abortire per più di quattro volte consecutive, oppure avere più di tre accoppiamenti infecondi successivi (Carmichael, 1990). Questi animali rappresentano un serbatoio d'infezione per i soggetti ancora sani all'interno dell'allevamento (Carmichael, 1968, Carmichael, 2012).

Nei maschi adulti infetti normalmente si riscontrano epididimite, atrofia testicolare monolaterale o bilaterale e dermatite scrotale. La palpazione dello scroto o del testicolo generalmente non evidenzia dolorabilità acuta. Generalmente è presente una diminuzione del volume dell'eiaculato senza perdita di libido da parte del soggetto, tuttavia è possibile poter riscontrare una certa sofferenza del soggetto all'atto dell'eiaculazione. Il seme dei maschi infetti presenta un numero notevole di anomalie spermatiche e di cellule infiammatorie, specialmente nel corso dei primi tre mesi d'infezione. Con la cronicizzazione dell'infezione si può arrivare alla aspermia, cui corrisponde l'insorgenza di atrofia testicolare bilaterale (Carmichael, 2012).

Oltre alle manifestazioni che interessano la sfera riproduttiva, l'infezione da *B. canis* può indurre anomalie anche in altri organi, sebbene esse si verifichino meno frequentemente. In alcuni soggetti ad esempio la linfadenopatia generalizzata può essere accompagnata da splenomegalia (Carmichael, 2012). Una manifestazione ben conosciuta e descritta dell'infezione da *B. canis* è la discospondilite (Henderson *et al.*, 1974). Questa può insorgere in cani apparentemente sani o in quelli che hanno avuto anamnesi di disordini riproduttivi e sono stati trattati con antibiotici (Kervin *et al.*, 1992; Hurov *et al.*, 1978). In sede di esame clinico i cani inizialmente accusano dolore in sede spinale, successivamente, se la compressione del midollo spinale aumenta, presentano paresi e atassia (Kornegay, 1983). L'incidenza della discospondilite è maggiore nei maschi rispetto alle femmine, probabilmente a causa della localizzazione di *B. canis* nella prostata, che può provocare batteriemia intermittente anche nei maschi castrati (Carmichael e Joubert, 1988; Kerwin *et al.*, 1992; Hurov *et al.*, 1978).

Sono stati descritti anche casi di osteomielite che interessano lo scheletro appendicolare e che si manifestano con zoppia sull'arto colpito (Smeak *et al.*, 1987). Sebbene l'insorgenza di meningoencefalite sia stata descritta solamente a seguito di infezione sperimentale, alcuni autori hanno rilevato la presenza di cambiamenti comportamentali, anisocoria, atassia, iperestesia e movimenti in circolo in un cane con infezione da *B. canis*, nel quale tali segni neurologici si manifestarono nelle tre settimane successive all'accoppiamento (Carmichael, 2012). In alcuni cani con infezione cronica da *B. canis* è stata descritta anche l'insorgenza di uveite anteriore ricorrente con edema corneale (Saegusa *et al.*, 1978; Reike e Rhodes, 1975). Altre possibili manifestazioni dell'infezione da *B. canis* possono essere rappresentate da poliartriti (Carmichael, 2012).

3. DIAGNOSI

3.1. Diagnosi clinica

La sintomatologia rilevabile alla visita clinica è in grado solamente di consentire il sospetto dell'infezione da *B. canis*. Poiché l'infezione da *B. canis* è una delle cause più comuni di disordini riproduttivi nei cani, dovrebbe essere esclusa prima di indagare su altre cause di infertilità o aborto (Carmichael, 2012). Tuttavia, se l'insufficienza riproduttiva non è documentata, la brucellosi canina può essere difficile da diagnosticare.

I valori ematologici e biochimici rimangono generalmente inalterati o comunque non mostrano alterazioni caratteristiche. Nei soggetti affetti da batteriemia cronica un rilievo indicativo dal punto di vista ematologico della presenza dell'infezione è rappresentato da una iperglobulinemia che interessa le frazioni β e γ . Anche le analisi biochimiche delle urine generalmente risultano normali, nonostante la possibile presenza di batteriuria.

Nei casi in cui si sviluppi meningoencefalite, l'analisi del liquido cefalo-rachidiano rivela la presenza di neutrofili e un aumento della concentrazione proteica, alterazioni che non si riscontrano se è presente solo discospondilite. Anche il rilievo radiologico riferibile a infezione del disco intervertebrale deve essere sempre seguito dalla ricerca sierologica e, quando possibile, dalla conferma batteriologica dell'infezione da *B. canis* (Carmichael, 2012).

L'esame del seme può essere invece di maggiore aiuto nella diagnosi presuntiva della malattia. Le anomalie spermatiche cominciano ad essere presenti a 5 settimane dall'infezione e divengono evidenti a partire dall'ottava settimana, finché, a 20 settimane, interessano più del 90% degli spermatozoi (George *et al.*, 1979). In ogni caso, le anomalie spermatiche indotte dall'infezione da *B. canis* non sono specifiche, per cui il rilievo di uno spermogramma anormale consente unicamente il sospetto di brucellosi (Berthelot e Garin-Bastuji, 1993).

3.2. Diagnosi di laboratorio

3.2.1. Metodi diretti

3.2.1.1 Isolamento

La diagnosi certa d'infezione da *B. canis* si ottiene solo con l'isolamento del germe. Tale metodo non mostra particolari difficoltà poiché il microrganismo cresce nei normali terreni di coltura utilizzati per tutte le altre specie del genere *Brucella* (Nicoletti e Chase, 1987b).

L'isolamento di *B. canis* è possibile a partire dal sangue, da prelievi freschi (materiale di scolo vulvo-vaginale, tessuti placentari e fetali, urine, sperma, latte) e da campioni prelevati in sede necroscopica (linfonodi, milza, prostata, epididimo, utero, midollo osseo, occhio, dischi intervertebrali) (Feldman e Nelson, 1996).

L'emocoltura rappresenta la metodica d'elezione per la conferma dell'infezione da *B. canis*, essendo tra tutte quella che dà la migliore probabilità di fornire riscontri positivi sui soggetti infetti, a condizione però che questi non siano stati sottoposti a terapia antibiotica (Carmichael, 2012). Nei soggetti infettati sperimentalmente per via orale la batteriemia inizia dopo 7 giorni dall'avvenuta esposizione, mentre l'emocoltura inizia a fornire risultati positivi a partire da 2-4 settimane dalla stessa. Se nel frattempo il soggetto non viene trattato con antibiotici, la positività alla emocoltura persiste di norma per almeno 6 mesi e può prolungarsi fino a 2 anni (Carmichael, 1990). A tal proposito la letteratura scientifica riporta anche casi di cani infettati sperimentalmente che sono rimasti positivi all'emocoltura per un periodo pari a 5,5 anni (Carmichael *et al.*, 1984).

Per quel che riguarda la messa in coltura di prelievi freschi, è sempre necessario che la semina venga effettuata su terreni selettivi, al fine di evitare lo sviluppo eccessivo di germi contaminanti (Carmichael, 2012). I campioni dovrebbero essere raccolti sterilmente in una provetta standard per coltura aerobica o in una provetta a tappo verde (anticoagulante litio-eparina), conservati a temperatura di refrigerazione (non congelati) e spediti entro 24 ore al laboratorio d'analisi, dove possono essere messi in coltura in terreno di Farrell o sul terreno di Thayer-Martin modificato (Carmichael e Greene, 2006; CFSPH, 2010; GDA, 2020).

I tessuti prelevati in sede autoptica che, in caso di infezione in atto, hanno la maggiore probabilità di fornire risposte positive alla coltura, sono rappresentati dai linfonodi e dalla milza; è possibile inoltre effettuare colture anche da campioni prelevati nelle sedi elettive di infezione da *B. canis*, quali l'occhio in caso di uveite o il disco intervertebrale in caso di discospondilite (Feldman e Nelson, 1996). Anche in questi casi la negatività della coltura non esclude l'infezione (Carmichael, 1990).

Sfortunatamente, le probabilità di rilevare questo microrganismo tramite coltura sono limitate dalla presenza di *B. canis* a basse cariche, all'eliminazione intermittente del germe da parte dei soggetti infetti, dalla possibile scarsa qualità dei campioni inviati in laboratorio, dalla eventuale manipolazione inappropriata del campione, dal fatto che il microrganismo può essere presente in forme esigenti e a crescita lenta, oppure da eventuali errori nell'utilizzo dei terreni di coltura (Carmichael e Greene, 2006). Pertanto, un risultato negativo alla coltura non può escludere l'infezione, poiché la bassa sensibilità della prova può condurre ad un numero non accettabile di falsi negativi. Sebbene la coltura sia da considerare inappropriata come test di screening, essa rappresenta tuttavia la prova ideale per la conferma d'infezione. La prova può dare risultati positivi già a 2-4 settimane dall'infezione e il cane può rimanere positivo per diversi anni (Hollett, 2006).

L'isolamento del batterio da campioni prelevati da un caso sospetto è il migliore strumento per confermare che l'animale è infetto da *B. canis*. È il metodo migliore per la diagnosi di infezione precoce nei cani che non hanno ricevuto un trattamento antibiotico. Sfortunatamente, un risultato negativo alla coltura batterica non conferma l'assenza di infezione o della necessità di una cura, poiché i batteri possono essere temporaneamente assenti dai tessuti sottoposti ad esame (Wanke, 2004).

I dati relativi ai possibili risultati della coltura in relazione al momento in cui viene effettuata e al materiale esaminato sono riassunti schematicamente nella **Tabella 1** (Da Feldman e Nelson, 1996, modificata).

Tabella 1. possibili risultati della coltura di *B. canis* in relazione al momento in cui viene effettuata e al materiale esaminato.

Materiale in coltura	Momento ottimale della coltura	Risultati previsti
Scolo post-abortivo	Quando presente	+ + +
Placenta	Quando presente	+ +
Feto	Quando presente	Possibile negatività
Sperma	3-11 sett. PI 12-60 sett. PI > 60 sett.	+ + + Riduzione del numero -
Sangue	5-30 sett. Dopo 30 sett. 6-12 mesi PI 28-48 mesi PI 48-58 mesi PI > 58 mesi PI	100% + Ad intermittenza >80% + 50-80% + 25-50% + < 25% +
Epididimo	35-60sett. PI > 100 sett. PI	50-100% + -
Urina	8-30 + sett. PI	Emissione di un numero maggiore di microrganismi nei maschi piuttosto che nelle femmine
Prostata	Fino a 64 sett.	Di solito +
Linfonodi, midollo osseo e milza	Durante la batteriemia Durante la fase abatteriemica	Di solito + +/-
Occhio	In caso di uveite	+ + +
Dischi intervertebrali	In caso di discospondilite	+/-

Simbologia: PI, post-infezione; +, positività; -, negatività.
Da Feldman e Nelson, 1996 (modificata).

3.2.1.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Diversi primer per PCR sono stati studiati per rilevare il DNA di *B. canis* nel sangue intero, nelle secrezioni vaginali e nello sperma. Data l'elevata sensibilità e specificità, la PCR può essere utilizzata come test rapido di screening o come conferma per i cani sieropositivi (Keid *et al.*, 2007; Kauffman *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014). La migliore correlazione dei risultati del test PCR è stata osservata con il test 2ME-RSAT (Mol *et al.*, 2020). La matrice d'elezione è il sangue intero prelevato con anticoagulante sodio citrato. L'esecuzione della PCR sul siero ha poco valore diagnostico poiché fornisce risultati insoddisfacenti in termini di sensibilità e comunque inferiori a quelli dell'emocoltura, della PCR sul sangue intero, della RSAT e della 2ME-RSAT. (Keid *et al.*, 2020).

Inoltre, l'uso di questa PCR non è ancora prontamente disponibile nella maggior parte dei laboratori diagnostici e rimane un test sperimentale (Hensel *et al.*, 2018). In effetti, il controllo e l'assicurazione della qualità sono fondamentali per le prove di ricerca di *B. canis*, in particolare per la PCR, al fine di

garantire l'accuratezza dei risultati della prova, visto il potenziale impatto che un risultato positivo o negativo può avere sui singoli cani, sulla popolazione canina di provenienza, su un singolo cliente o su un operatore di canile (Cosford, 2018).

Supponendo che si riesca a migliorarne l'accuratezza dei risultati, i vantaggi della PCR sono costituiti dalla possibilità di individuare la specie e (talvolta) la biovar di *Brucella* implicata nell'infezione, dalla migliore sensibilità e specificità della prova, dai minimi requisiti richiesti riguardo al contenimento biologico, dal tempo relativamente breve per ottenere i risultati e dalla possibilità di eseguire un fingerprinting genetico utile ad agevolare le indagini epidemiologiche finalizzate al controllo della malattia (Yu e Nielsen, 2020). Un'altro dei vantaggi del test PCR è quello di poter essere effettuato su materiale che non richiede procedure invasive di prelievo, quali i tamponi vaginali o le urine (Kauffman *et al.*, 2014).

La maggior parte dei saggi PCR per il rilievo di *B. canis* riportati in letteratura sono basati sul rilievo di genere *Brucella* e non specie-specifiche per *B. canis*. In passato, sono state allestite anche PCR multiplex per distinguere tra alcune specie di *Brucella*, inclusa *B. canis* (López-Goñi *et al.*, 2011). Negli ultimi anni sono state sviluppate e valutate anche PCR specifiche per *B. canis* (Kaden *et al.*, 2014; Kauffman *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014; Boeri *et al.*, 2018). Questi saggi devono ancora essere sottoposti a una valutazione approfondita sulle popolazioni canine al fine di valutarne la sensibilità e la specificità. Fino a quel momento, le informazioni provenienti dalle prove di PCR dovrebbero essere utilizzate solo congiuntamente alle informazioni relative alla clinica e alla sierologia (Cosford, 2018).

Lo stato delle differenti ricerche ad oggi disponibili sulla PCR per *B. canis* è stato recentemente riassunto da Cosford (2018).

3.2.2. Metodi indiretti

La diagnosi sierologica dell'infezione della *B. canis* è possibile mediante utilizzo di vari test, dei quali l'agglutinazione rapida sul vetrino (RSAT=Rapid Slide Agglutination Test e 2ME-RSAT= Mercaptoethanol-Rapid Slide Agglutination Test) e l'agglutinazione in provetta (TAT=Tube Agglutination Test e 2ME-TAT) rappresentano, nei Paesi in cui la malattia è presente, i test più usati in campo insieme al test di immunodiffusione in gel di agar (AGID=Agar Gel Immuno-Diffusion), sia nella variante che utilizza antigeni di parete cellulare (AGIDcwa), sia nella variante che utilizza antigeni citoplasmatici (AGIDcpa). Altri test possibili includono l'immunofluorescenza indiretta (IFA=Indirect Fluorescent Antibody Assay), la fissazione del complemento (CFT= Complement Fixation Test) e i test immunoenzimatici (ELISA=Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), tutti comunque usati esclusivamente in occasione di studi sperimentali (Carmichael e Shin, 1996; Carmichael e Greene, 2006; Hollett, 2006; Keid *et al.*, 2009).

È importante ricordare che *B. canis* non presenta antigeni di parete cellulare in fase liscia come *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*, ma antigeni in fase rugosa (Carmichael e Bruner, 1968), analogamente a *B. ovis*. Pertanto, i test sierologici tesi al rilievo di anticorpi contro *B. canis* devono basarsi su un antigene di parete di *B. canis* o *B. ovis* (i quali cross-reagiscono completamente tra loro), oppure su un antigene citoplasmatico di *B. abortus* o di *B. canis*. Qualsiasi sia il test o l'antigene usato, la presenza di anticorpi anti-*B. canis* nel sangue non è normalmente rilevabile prima delle 5-8 settimane dall'infezione (Carmichael, 1990) e i risultati del test potrebbero essere negativi durante le prime 3-4 settimane di infezione, sebbene il cane possa essere in condizione di batteriemia già a due settimane dal contagio (Carmichael e Greene, 2006). Dopo la cessazione della batteriemia la quantità di anticorpi nel sangue dei soggetti infetti comincia a scendere, pur rimanendo ancora rilevabile per un periodo di 4-6 mesi, finché, dopo tale periodo, i test sierologici risultano negativi o dubbi (Carmichael, 1990). Il titolo anticorpale può fluttuare anche in presenza di batteriemia persistente ed il suo valore non riflette lo stadio della patologia in corso, inoltre un eventuale calo di detto valore non necessariamente indica correttamente l'efficacia della terapia (Feldman e Nelson, 1996).

I principali test sierologici utilizzabili per la ricerca di anticorpi anti *B. canis* e le relative caratteristiche sono stati sintetizzati da Carmichael e Shin (1996, **Tabella 2**) e da Cosford (2018, **Tabella 3**).

Tabella 2. Principali test sierologici utilizzabili per la ricerca di anticorpi anti *B. canis* e relative caratteristiche. Da Carmichael e Shin (1996), modificata.

Test	Natura dell'antigene	Limiti di positività ^(a)	Commenti
2ME-RSAT	Parete cellulare	Da 5-8 sett. PI fino a 3 mesi dalla cessazione della batteriemia (risultati variabili successivamente)	Elevata sensibilità (99%); ridotta specificità (50%-80%); semplice e rapida esecuzione.
TAT	Parete cellulare	Simili a 2ME-RSAT.	False positività come in 2ME-RSAT; semiquantitativo; titoli superiori a 1:200 sono indicativi di infezione in atto.
2ME-TAT	Parete cellulare	Simili a 2ME-RSAT.	Specificità leggermente più elevata rispetto a TAT; procedimento più lungo.
AGID _{cpa}	Parete cellulare	Simili a 2ME-RSAT, possibilità di rilevamento 1-2 settimane prima.	Maggiore Sensibilità rispetto a RSAT; permanenza di frequenti reazioni con precipitine non specifiche; complessità di esecuzione; difficoltà d'interpretazione
AGID _{cwa}	Citoplasma	Da 8-12 sett. PI ad almeno 12 mesi dalla fine della batteriemia, finanche a 36 mesi.	Maggiore specificità (97%); ma minore sensibilità; rivela casi cronici negativi ad altri test; rivela infezioni da altre brucelle.
ELISA	Parete cellulare Citoplasma	Sconosciuta, ritenuta simile a TAT	Tecnica in fase sperimentale; Elevata specificità usando antigeni di parete di <i>B. canis</i> in fase M o antigeni citoplasmatici.
IFA	Parete cellulare	Sconosciuta	Dati non pubblicati; sembra avere minore sensibilità rispetto al 2ME-TAT.

Simbologia: RSAT, test di agglutinazione rapida su vetrino; ME, test con 2-mercaptoetanolo; TAT, test di agglutinazione in provetta; AGID, immunodiffusione su gel di agar; ELISA, test immunoenzimatico; IFA, test di immunofluorescenza; PI, post-infezione; +, positivo; -, negativo.

Note: (a) i tempi sono approssimati.

Tabella 3. Confronto tra i test sierologici tradizionali per la diagnosi della brucellosi canina. Da Cosford (2018), modificata.

Test	Antigene	Sensibilità	Specificità	Utilizzo del test
RSAT	<i>B. ovis</i> Ceppo di <i>B. canis</i> (M-)	Da moderata a elevata -studi più datati suggeriscono elevata -studi più recenti suggeriscono 70,58%	Da bassa a moderata -studi più datati suggeriscono 40%-50% -studi più recenti suggeriscono 83,34%	Test di screening
2-ME-RSAT	Ceppo di <i>B. canis</i> (M-)	Inferiore alla RSAT (31,76% contro 70,58%)	Superiore alla RSAT (100% contro 83,34%)	Test di conferma
TAT	<i>B. canis</i>	Elevata	Bassa	Test di screening
IFA	Immunoglobuline IgG anti-cane dirette contro anticorpi nei confronti di <i>B. canis</i>	Sconosciuta	Sconosciuta	Test di screening
AGID _{cwa}	Antigene lipopolisaccaridico di parete cellulare di <i>B. canis</i>	Elevata	Inferiore a AGID _{cpa}	Test di screening

AGID _{cpa}	Antigene solubile LPS-free da proteine citoplasmatiche estratte da <i>B. canis</i> o <i>B. abortus</i>	Bassa -52,94 di sensibilità -47,06 di false negatività	Elevata 100%	Test di conferma
---------------------	--	--	-----------------	------------------

3.2.2.1 Test di agglutinazione rapida su vetrino (RSAT e 2ME-RSAT)

Il RSAT nella tecnica originale elaborata da George e Carmichael (1974) utilizza come antigene *B. ovis* inattivata al calore e colorata con Rosa Bengala, oppure può impiegare *B. canis*. È un test rapido, di facile esecuzione e lettura, disponibile in commercio e di facile utilizzo pratico. L'agglutinazione è rilevabile già a 3-4 settimane dopo l'inizio dell'infezione (Hollett, 2006). Il test è dotato di una sensibilità (intesa come la probabilità del test di non dar luogo a reazioni falsamente negative) pari al 99% (Carmichael, 1990). Al contrario la specificità (intesa come la probabilità del test di non dar luogo a reazioni falsamente positive) è ridotta, comprendendo percentuali di falsi positivi che vanno comunemente dal 20% fino a raggiungere anche il 50% (Carmichael e Shin, 1996). Le false positività sarebbero apparentemente prodotte da reazioni crociate fra l'antigene utilizzato e gli anticorpi specifici, eventualmente presenti nel siero testato, contro batteri appartenenti ad altri generi, quali *Pseudomonas* spp., *Bordetella* spp., *Streptococcus* spp. e, più in generale, alcune *Enterobacteriaceae* (Carmichael, 2012).

Al fine di ridurre incidenze di false positività, il test RSAT è stato quindi modificato includendo l'aggiunta al siero in esame di 2-mercaptoetanolo (2ME-RSAT) prima della sua miscelazione con l'antigene. Il 2-mercaptoetanolo riduce l'incidenza di false positività sostanzialmente perché inattiva gli anticorpi della classe IgM, meno specifici (Badakhsh *et al.*, 1982). Una ulteriore modifica del test RSAT, descritta da Carmichael e Joubert (1988) e che sostituisce l'antigene *B. ovis* con un antigene derivato da *B. canis* in fase M (mucoide), riduce ulteriormente il tasso di false positività fino a portarlo a circa il 10%. Un animale può essere positivo per 30 mesi dopo la cessazione della batteriemia, anche se possono verificarsi falsi negativi durante le prime 8 settimane dall'infezione (Hollett, 2006).

Pertanto, dato che le false negatività a questo test sono rare, lo stesso può essere utilizzato come test di screening per individuare e separare i soggetti negativi, per poi concentrarsi con altri test sui soggetti risultati positivi (Wanke, 2004).

3.2.2.2. Test di agglutinazione in provetta (TAT)

La tecnica è stata descritta da Carmichael e Kenney (1968) e da Alton *et al.*, (1975). Il TAT è in gradi di rilevare gli anticorpi nei confronti di *B. canis* nei cani risultati positivi a RSAT o 2ME-RSAT. Il test comincia a fornire risultati positivi già 2-4 settimane dopo l'esposizione o la batteriemia (Hollett, 2006). Il TAT permette la titolazione anticorpale specifica e consiste nell'aggiunta a differenti diluizioni del siero in esame di una dose fissa di antigene costituita da *B. canis* inattivate al calore (Feldman e Nelson, 1996). Il test è sensibile ma poco specifico, consentendo risultati falsi positivi (Hollett, 2006). Anche in questo caso l'aggiunta di 2-mercaptoetanolo (2ME-TAT) limita l'incidenza di false positività (Carmichael, 1990). Sebbene non siano stati pubblicati dati completi sull'attendibilità di tale test, i sieri sono giudicati negativi fino ad un titolo agglutinante di 1:50 e dubbi fino ad un titolo agglutinante di 1:200. Titoli superiori a 1:200 vengono considerati indicativi di infezione in atto e la prova va ripetuta a distanza di 1-2 mesi al fine di verificare se il titolo anticorpale rimanga stabile, decresca o incrementi. In ogni caso per la conferma dell'infezione è necessaria l'emocoltura (Fredrickson e Barton, 1974; Rhoades e Mesfin, 1980; Flores-Castro e Carmichael, 1977; Henderson *et al.*, 1974; Carmichael e Shin, 1996). C'è buona correlazione tra un titolo alla TAT $\geq 1:200$ e l'isolamento del microrganismo tramite emocoltura (Hollett, 2006).

Attualmente, nei Paesi in cui la malattia è presente, in special modo negli Stati Uniti, l'uso del 2ME-TAT nei laboratori è stato abbandonato, alla luce del fatto che da un lato fornisce gli stessi risultati ottenibili con il 2ME-RSAT (tecnica effettivamente di più facile esecuzione) e dall'altro la difficoltà di standardizzare le tecniche e gli antigeni rendono difficile il confronto fra i risultati ottenuti in laboratori differenti (Carmichael e Shin, 1996). Essendo comunque un test semiquantitativo, viene ancora oggi usato nei canili in cui è stata diagnosticata brucellosi da *B. canis*, al fine di valutare indirettamente, tramite il calo del titolo anticorpale agglutinante, la risposta alla terapia antibiotica (Carmichael e Shin, 1996), anche se tale correlazione non è stata ancora sufficientemente dimostrata (Nicoletti e Chase, 1987a).

3.2.2.3. Test di immunodiffusione in gel di agar (AGID)

L'AGID può impiegare due tipi diversi di antigeni: un antigene di parete di *B. canis* (AGIDcwa) oppure proteine antigeniche estratte da citoplasma di *B. canis* o di altre specie del genere *Brucella* (AGIDcpa), in particolare *B. abortus* (Carmichael e Shin, 1996). La tecnica è stata descritta da Zoha e Carmichael (1982).

AGIDcwa: L'impiego dell'antigene di derivazione citoplasmatica determina un ulteriore aumento della specificità del test, portando la percentuale di false positività al 3% (Zoha e Carmichael, 1982), mentre lo stesso test, condotto utilizzando l'antigene di parete, soffre degli stessi problemi di false positività propri dei test di agglutinazione descritti precedentemente (Carmichael, 2012). In ogni caso, l'antigene lipopolisaccaridico di parete è meno specifico dell'antigene citoplasmatico. Pertanto, la AGIDcwa è sì dotata di alta sensibilità ma possiede ancora probabilità di fornire risultati falsamente positivi. I risultati cominciano ad essere positivi a 8-12 settimane dall'infezione e possono permanere tali per 3-4 anni (Hollett, 2006).

AGIDcpa: L'antigene usato è più specifico ma meno sensibile poiché può reagire con gli anticorpi contro altre specie *Brucella* (ad es. *canis*, *abortus*, *suis*) (Hollett, 2006). Lo svantaggio nell'utilizzazione dell'antigene di derivazione citoplasmatica consiste nel maggior periodo di tempo che intercorre fra l'esposizione all'infezione e il risultato positivo al test, che si aggira sulle 8-12 settimane, cosa che lo rende poco indicato nello svelare gli stadi precoci della malattia. D'altro canto, la positività al test permane per un periodo superiore, corrispondente a circa 12 mesi dalla cessazione della batteriemia, per cui tale test, rispetto ai test di agglutinazione descritti precedentemente, è di maggiore utilità nello svelare infezioni croniche (Carmichael, 2012). In letteratura ci sono segnalazioni di persistenza di positività a tale test fino a più di cinque anni dall'avvenuta infezione (Hollett, 2016).

Alla luce di quanto detto, il test AGIDcpa, eseguito con l'impiego di antigene *B. canis* di derivazione citoplasmatica, costituisce la tecnica di maggiore sensibilità e specificità in allevamenti canini infetti da *B. canis*, utilizzabile pertanto come test di conferma per quei sieri che eventualmente avessero dato risultati positivi ai test di agglutinazione prima descritti, fermo restando che la diagnosi definitiva di infezione da *B. canis* sul singolo soggetto è possibile solo a seguito di emocoltura (Carmichael e Shin, 1996, Cosford *et al.*, 2018).

Un numero limitato di laboratori diagnostici veterinari sono in grado di condurre AGID (Hollett, 2006). La scarsa diffusione della tecnica AGID è connessa alle difficoltà d'allestimento e purificazione degli antigeni e alla necessità per l'esecuzione, di laboratori con apparecchiature e terreni dedicati e personale specializzato (Feldman e Nelson, 1996; Hollett, 2006).

3.2.2.4. Test di immunofluorescenza indiretta (IFA)

Questo test si è rivelato più sensibile e specifico dei test di agglutinazione (Weber e Hussein, 1976). Tuttavia, i risultati del Laboratorio diagnostico della Cornell University indicano un alto tasso di reazioni false positive con il test IFA (Wanke, 2004). Il test può essere considerato un'alternativa quando RSAT e TAT non sono disponibili. Tuttavia, poiché la sensibilità dell'IFA non è del tutto nota, esiste la probabilità che cani infetti possano non essere individuati al controllo (Carmichael e Greene, 2006).

3.2.2.5. Test immunoenzimatico (ELISA)

Lo stato delle differenti ricerche ad oggi disponibili sulle tecniche ELISA per il rilievo di anticorpi contro *B. canis* è stato recentemente riassunto da Cosford (2018).

Questi test sono stati sviluppati sia con antigeni di parete cellulare di *B. canis* (M- e RM 6/66), sia con antigeni citoplasmatici di *B. abortus*, comuni a tutti i ceppi del genere *Brucella* (Baldi *et al.*, 1997). Questi ultimi antigeni hanno il vantaggio di non mostrare reattività crociata con i batteri appartenenti a generi diversi da *Brucella* spp., ma danno risultati positivi con qualsiasi batterio del genere *Brucella*. Test ELISA eseguiti con antigeni di parete dei ceppi di brucella in fase M- sono altamente specifici ma un po' meno sensibili (Serikawa *et al.*, 1989; Mateau de Antonio *et al.*, 1993), mentre quelli eseguiti con il cappelletto RM 6/66 mostrano un'alta percentuale di falsi positivi (Mateau de Antonio *et al.*, 1993).

3.2.2.5. Test di fissazione del complemento (CFT)

Il test di Fissazione del Complemento è stato descritto da Alton *et al.* (1975) e Weber e Krauss (1977). Ha mostrato una buona correlazione con i dati del TAT (Weber e Krauss, 1977). Non è normalmente un

test usato di routine poiché il siero di cane spesso mostra attività anticomplementare (Alton *et al.*, 1975; Weber e Krauss, 1977).

3.2.2.6. Interpretazione dei test diagnostici

I differenti test sierologici disponibili hanno livelli differenti di sensibilità e specificità in relazione allo stadio della malattia, al tipo di metodo e al tipo di antigene usati. L'anamnesi e i dati clinici devono essere utilizzati congiuntamente ai risultati della sierologia e della batteriologia per addivenire ad una diagnosi definitiva (Wanke, 2004).

Risultati falsamente negativi possono registrarsi a seguito di prelievo effettuato precedentemente alla sieroconversione o per la possibile presenza di bassi titoli di anticorpi circolanti in alcuni soggetti cronicamente infetti (Carmichael e Greene, 2006).

I risultati falsamente positivi costituiscono invece la maggiore preoccupazione per questi test sierologici. Tali risultati sono dovuti a reazioni crociate specifiche e aspecifiche con antigeni di superficie condivisi con altri microrganismi, quali ad esempio *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus equuli*, *Streptococcus* spp., *Stafilococcus* spp., microrganismi *Moraxella*-type e batteri Gram-negativi (Carmichael e Greene, 2006; Hollett, 2006; CFSPH, 2020; Yu e Nielsen, 2010). Un test di screening a elevata sensibilità dovrebbe quindi essere seguito con un test di conferma ad elevata specificità come il 2ME-RSAT o il test di immunodiffusione in gel di agar allestito con antigene citoplasmatico interno (AGIDcpa) (Carmichael e Greene, 2006; Hollett, 2006; Keid *et al.*, 2009; Cosford, 2018).

Sebbene RSAT, 2ME-RSAT e TAT rilevino anticorpi agglutinanti del cane, questi non proteggono il soggetto dall'infezione (Pollock, 1979). A tale riguardo, il cane può rimanere batteriemico per anni nonostante la presenza di titoli anticorpali agglutinanti (Serikawa e Muraguchi, 1979; CDC, 1977).

4. TERAPIA

Il trattamento della brucellosi canina da *B. canis* è possibile, anche se spesso i risultati sono deludenti, a causa della localizzazione intracellulare del batterio per lunghi periodi e alla sua abilità di generare batteriemie episodiche (Carmichael, 1990). Per tali motivi, pur essendo la *B. canis* sensibile in vitro a diversi antibiotici, spesso la terapia non risulta efficace o comunque dà luogo a recidive.

Tra i vari protocolli terapeutici proposti, quello che ha dato i risultati migliori prevede la somministrazione di tetraciclina (25 mg/Kg t.i.d., PO) per quattro settimane, con l'associazione di diidrostreptomicina (10 mg/Kg b.i.d, IM) durante la prima e l'ultima settimana di terapia. (Carmichael, 1996). Tale schema terapeutico sperimentale ha portato il 94% degli animali trattati alla negativizzazione sierologica nell'ambito dei due mesi successivi al trattamento (Nicoletti, 1991).

La terapia ha minor successo nei maschi rispetto alle femmine, probabilmente per la maggiore difficoltà che si incontra nella eliminazione dei focolai d'infezione dal tratto genitale maschile, in special modo dalla prostata (Carmichael, 1990). Nonostante il trattamento, i soggetti maschi possono comunque sviluppare sterilità irreversibile e ciò, unitamente alla difficoltà di eliminare l'infezione dalla prostata, suggerisce di escludere comunque tali soggetti dalla riproduzione (Carmichael, 2012).

La variabilità dei risultati ottenuta dai vari autori nell'applicazione dei protocolli terapeutici sperimentali (Flores-Castro e Carmichael, 1981; Zoha e Walsh, 1982; Nicoletti e Chase, 1987a; Nicoletti, 1991) è in funzione anche del criterio di giudizio adottato per stabilire l'avvenuta guarigione (negativizzazione rispettivamente agli esami batteriologici o sierologici) (Carmichael e Shin, 1996). In ogni caso, alla luce del fatto che l'infezione può recidivare anche dopo settimane o mesi dalla cessazione della terapia, si consiglia di attuare un monitoraggio sierologico del paziente per almeno i tre mesi successivi alla cessazione stessa, ripetendo il ciclo terapeutico nel caso si riscontrino positività sierologica (Carmichael, 1996). In aggiunta a ciò, si consiglia la sterilizzazione del soggetto (Carmichael, 1990).

Il clinico dovrà informare con franchezza il proprietario dei problemi connessi alla riuscita della terapia, dal momento che la stessa, unitamente al monitoraggio che richiede, da un lato risulta molto onerosa e dall'altro non offre risultati prevedibili, anche in considerazione delle difficoltà legate alla interpretazione dei risultati ottenuti (Feldman e Nelson, 1996).

5. PROFILASSI

5.1. Profilassi indiretta

Per quel che concerne la profilassi indiretta, sono state effettuate prove tese all'allestimento di un vaccino efficace, tuttavia esse non hanno fornito risultati incoraggianti. Peraltro, l'esistenza di un vaccino per certi aspetti potrebbe non essere desiderabile, dal momento che interferirebbe con le prove sierologiche eventualmente effettuate per individuare i soggetti infetti (Carmichael, 1990).

5.2. Profilassi diretta

5.2.1. Gestione degli allevamenti indenni e prevenzione della diffusione tra gli allevamenti

Alla luce dell'assenza di disponibilità di un vaccino efficace, la prevenzione della brucellosi canina da *B. canis*, nei territori in cui la malattia è presente, prevede le classiche misure sanitarie di profilassi diretta, basate su regolari controlli sierologici degli animali presenti nei canili o negli allevamenti.

È necessario implementare rigide misure di biosicurezza, insieme ad un'adeguata gestione dell'allevamento e rigorosi controlli ambientali (pulizia, disinfezione, assicurazione di temperatura e umidità adeguate). È necessario prestare particolare attenzione a pulire e disinfettare adeguatamente su base giornaliera i siti di parto e i locali dove sono ospitati i cuccioli appena nati (USDA, 2015).

Quarantena

I canili indenni dovrebbero mantenere in quarantena qualsiasi soggetto di nuova introduzione, sottoponendolo nel frattempo ad almeno due test sierologici specifici eseguiti a distanza di tempo ammettendoli a contatto con gli altri solo qualora entrambi i test risultassero negativi (Carmichael, 1996). Il modo migliore per tenere la brucellosi fuori dal canile è quindi di isolare e testare tutti i cani in arrivo, dimostrandoli negativi prima di inserirli nel canile. Ciò si ottiene meglio isolando i cani appena acquistati in un edificio o in una struttura separata, lontano dal resto della popolazione, per un minimo di otto settimane. Tutti i cani in arrivo devono essere testati per *B. canis* all'arrivo e di nuovo dopo otto settimane. Solo dopo aver ottenuto due test di screening negativi tutti i cani della struttura di isolamento, possono essere trasferiti in sicurezza a contatto con il resto della popolazione dell'allevamento. Se durante questo periodo di isolamento di otto settimane dovessero rilevarsi soggetti in isolamento sui quali viene diagnosticata la brucellosi, questi devono essere immediatamente allontanati dalla struttura. Il periodo di isolamento di otto settimane sarà quindi riavviato per i restanti cani in isolamento. L'approccio di isolamento in quarantena abbinato a test di laboratorio ha dimostrato di essere il modo più sicuro per introdurre nuovi cani in una popolazione riproduttiva consolidata senza il timore di introdurre brucellosi o altri agenti infettivi (USDA, 2015).

Controlli nei riproduttori

L'infezione da *B. canis* assume particolare importanza nei confronti dei soggetti destinati alla riproduzione, in virtù del fatto che normalmente costituisce un problema che costringe a porre termine alla loro carriera riproduttiva (Carmichael, 1990). Negli allevamenti situati in aree in cui la malattia è endemica, andrebbero fatti controlli sierologici annuali dei riproduttori, abbinati ad un ulteriore controllo da effettuarsi almeno tre settimane prima di ogni accoppiamento (Feldman e Nelson, 1996).

Idealmente, i cani riproduttori non dovrebbero mai lasciare le strutture dell'allevamento se non per essere visitati da un veterinario per le cure necessarie (e.g. taglio cesareo, lesioni gravi o malattie). È consigliabile mantenere la popolazione di cani da riproduzione al riparo in canile e non mandare le femmine fuori per accoppiamento. Questi soggetti potrebbero costituire un rischio di introduzione della malattia, pertanto, qualsiasi cane che lascia la struttura per accoppiamento o per qualsiasi motivo diverso da un taglio cesareo dovrebbe essere testato 90 giorni dopo il suo ritorno per confermare il suo stato negativo. È meglio isolare questi soggetti dal resto della popolazione del canile al loro rientro, anche se farlo potrebbe non essere pratico in quanto potrebbe richiedere l'isolamento durante la gestazione e il parto, il che potrebbe essere problematico in alcune strutture (USDA, 2015).

Un approccio alternativo per il miglioramento genetico della popolazione dell'allevamento potrebbe essere l'uso dell'inseminazione artificiale (IA) per le femmine da riproduzione, tramite sperma ottenuto

da cani riproduttori esterni dimostrati negativi per *B. canis* (due test negativi a distanza di almeno otto settimane prima di raccolta del seme). Se i cani maschi dell'allevamento devono essere utilizzati per accoppiamenti all'esterno, l'approccio più sicuro sarebbe quello di offrire questo servizio solo attraverso l'uso dell'IA, tramite sperma raccolto nei locali e quindi spedito al canile esterno senza che la femmina venga introdotta nella struttura o il maschio ne esca (USDA, 2015).

Controllo di altri ingressi

Negli allevamenti indenni andrebbe impedito l'ingresso di cani randagi. Parimenti andrebbe evitato il contatto con animali o gruppi di animali di stato sanitario sconosciuto o dubbio, in particolare nel caso di concorsi o accoppiamenti (Carmichael, 1996).

I visitatori (incluso gli stessi clienti dell'allevamento) non devono aver visitato nessun altro allevamento nello stesso giorno, dovrebbero indossare indumenti puliti, disinfettare le scarpe, indossare copriscarpe protettivi usa e getta e lavarsi adeguatamente le mani. Idealmente, i visitatori non dovrebbero toccare o maneggiare cani o attrezzature. Una soluzione potrebbe essere prevedere l'accesso senza contatto diretto utilizzando una visualizzazione in video della madre e del padre, nonché della figliata durante il periodo di cure parentali. Ciò eliminerebbe la maggior parte del rischio diretto di trasmissione della malattia fino a quando il cucciolo non viene spostato nella sua nuova sistemazione (USDA, 2015).

Isolamento e disinfezione al parto

Sarebbe altresì opportuno l'isolamento delle femmine al momento del parto, così come la regolare disinfezione dei locali dei canili o degli allevamenti in generale e delle sale parto in particolare (Berthelot e Garin-Bastuji, 1993).

5.2.2. Gestione degli allevamenti infetti

Qualora si riscontrasse l'infezione in un canile o in un allevamento, l'intera popolazione presente dovrà essere confinata (divieto di ingresso/uscita di animali) e sottoposta a test sierologici. La totalità dei soggetti presenti dovrà essere considerata sospetta d'infezione. Una proposta di gestione di tali allevamenti è riportata in **Allegato 1**.

Protezione degli operatori

Per ridurre le probabilità di esposizione a *B. canis*, il personale addetto operante nei canili o negli allevamenti di cani dovrebbe indossare guanti protettivi monouso durante l'assistenza al parto, compresa la manipolazione di cuccioli neonati, della placenta, delle membrane fetali e il possibile contatto con urine o secrezioni vaginali. Si deve prestare estrema attenzione quando si maneggiano materiali di un eventuale aborto, inclusi cuccioli morti o parzialmente sviluppati, le loro membrane fetali e le placente. I guanti protettivi devono essere utilizzati anche durante l'assistenza per la fecondazione, sia naturale sia artificiale. Nelle situazioni di quarantena e isolamento, oltre al semplice uso di guanti, sarebbe consigliabile un uso appropriato di dispositivi di protezione individuale (*i.e.* protezione respiratoria e oculare) per prevenire l'infezione da *B. canis* durante la pulizia e la disinfezione dei locali o la manipolazione degli animali. Si raccomanda inoltre di prestare attenzione nel raccogliere e manipolare sangue, siero, fluidi o tessuti per le analisi di laboratorio sia ai veterinari, sia al personale, sia ai proprietari, sia al personale di laboratorio (USDA, 2015).

Censimento degli animali presenti

Prima di iniziare i controlli va eseguita una accurata ricognizione della corrispondenza dei registri del canile o dell'allevamento con gli animali effettivamente presenti. Successivamente va creato un registro dei controlli dove gli animali sono distinti per sesso, razza ed età, avendo cura di indicare specificatamente per ciascuno la data di nascita, in modo che si possano individuare facilmente i soggetti da sottoporre a controllo.

Rintraccio degli animali

Occorre identificare la fonte d'ingresso dell'infezione e la sua eventuale uscita. Allo scopo, vanno rintracciati tutti i canili o allevamenti di provenienza degli animali introdotti nella struttura infetta, i quali vanno sottoposti alle stesse disposizioni adottate nella struttura stessa. Parimenti, vanno rintracciate tutte le movimentazioni in uscita dalla struttura infetta e gli animali, i canili e gli allevamenti in tal modo rintracciati vanno sottoposti alle stesse disposizioni adottate nella struttura stessa.

Controlli sugli animali

Una volta diagnosticata la Brucellosi, l'unico modo per riottenere l'indennità è l'allontanamento di tutti i cani positivi presenti nel canile.

Occorre testare sierologicamente tutti i cani di età superiore ai sei settimane con un primo test di screening (ad es. RSAT, 2ME-RSAT o TAT). I cani da sottoporre a test non devono aver ricevuto alcun trattamento antibiotico nei tre mesi precedenti al prelievo del campione (Hollett *et al.*, 2006). I cani risultati negativi al primo test di screening dovranno essere sottoposti ad un secondo test di screening da effettuare almeno a 4 settimane di distanza. I cani risultati negativi a questo secondo test possono essere considerati come non infetti da *B. canis*.

I cani risultati positivi al primo test sierologico devono essere classificati come sospetti d'infezione da *B. canis* (USDA, 2015), dovranno essere isolati e dovranno essere sottoposti ad un test di conferma (ad es. AGIDcwa) da effettuarsi non prima di 4 settimane, rimanendo isolati finché non si ottenga il secondo responso. Se anche il secondo test risulta positivo, i soggetti in questione dovranno essere considerati sospetti d'infezione e allontanati dalla colonia, riservandosi la conferma della diagnosi tramite emocoltura (Feldman e Nelson, 1996), oppure tramite un terzo test diagnostico (ad es. AGIDcpa), che potrebbe essere eseguito otto settimane dopo il secondo test al fine di confermare o escludere definitivamente la brucellosi (USDA, 2015).

Una proposta di algoritmo diagnostico per la gestione di tali controlli è riportata in **Allegato 1**.

I cuccioli nati da madri positive o comunque di età inferiore a 6 settimane al momento del controllo devono essere sottoposti a tre emocolture effettuate a distanza di 24 ore. I cuccioli con almeno una emocoltura positiva vanno allontanati dall'impianto. I cuccioli di età superiore a sei settimane al momento del controllo devono seguire lo stesso protocollo diagnostico degli adulti (Hollett, 2006).

Per raggiungere lo stato di allevamento indenne da *B. canis*, le prove vanno ripetute sui cani rimanenti ogni quattro settimane fino a quando non si abbiano due test consecutivi negativi sulla intera popolazione del canile. (USDA, 2015; Carmichael, 1996).

Isolamento degli animali positivi – divieto di monta e di vendita

I cani infetti o sospetti d'infezione devono essere mantenuti fisicamente isolati dai cani non infetti. Tuttavia, ciò può non essere fattibile o sufficiente per impedire la diffusione della malattia, anche se si mantengono le più strette misure igieniche (Carmichael e Joubert, 1988). Per questo motivo si raccomanda di allontanare tutti gli animali infetti dall'impianto (Wanke, 2004).

In caso di allevamento sospetto di infezione da *B. canis* o infetto da *B. canis* si raccomanda di porre in essere procedure di isolamento per i cani positivi e di interrompere qualsiasi commercio o scambio di soggetti positivi o di cuccioli nati da madri positive. Oltre a ciò, si consiglia vivamente di interrompere tutte le vendite o cessioni di tutti i cani presenti, a qualsiasi titolo, fino al raggiungimento dello stato di allevamento indenne da *B. canis*.

In relazione alla situazione epidemiologica dell'allevamento, tenendo conto anche delle eventuali problematiche eventualmente presenti in relazione al benessere dei cani ospitati, I veterinari del Servizio Sanitario Nazionale competenti per area e per territorio devono verificare se un allevamento sospetto oppure infetto debba essere sottoposto ad una quarantena rigorosa (che implica il divieto di vendita o cessione di qualsiasi soggetto fino al raggiungimento dello stato di allevamento indenne da *B. canis*) oppure ad una quarantena parziale, in cui è vietato vendere o cedere solo gli animali positivi e i cuccioli di femmine positive.

I veterinari responsabili dell'allevamento dovrebbero raccordarsi in maniera stretta con i rispettivi veterinari dei Servizi ASL competenti per territorio per concordare le modalità di gestione della quarantena in relazione alla idoneità delle strutture, ai controlli sierologici periodici, all'allontanamento e isolamento degli animali positivi e al rispetto delle norme sul benessere animale

Distruzione invogli fetali e feti abortiti

Le femmine devono partorire in locali separati adeguatamente lavabili e disinfettabili. La placenta e gli invogli fetali devono essere allontanati distrutti. Parimenti devono essere allontanati e distrutti i feti abortiti o cuccioli morti prima dello svezzamento.

Pulizia e disinfezione

B. canis non sopravvive per lunghi periodi nell'ambiente ed è normalmente sensibile ai comuni disinfettanti, quali sali quaternari d'ammonio e iodofori (Carmichael, 1990) o alla luce solare diretta (USDA, 2015). *Brucella* è inoltre sensibile all'ipoclorito di sodio all'1%, all'etanolo al 70%, alle soluzioni alcool/iodio, alla glutaraldeide e alla formaldeide (Hollett, 2006). In presenza di detriti organici, *B. canis* rimane stabile nell'ambiente per un massimo di due mesi (una pulizia e una disinfezione adeguate sono quindi indispensabili). *B. canis* può resistere all'essiccamento in presenza di detriti organici, può resistere al congelamento e può sopravvivere in acqua, polvere e terra. La combinazione di detriti organici, elevata umidità, basse temperature e poca o nessuna luce solare favorisce la sopravvivenza dell'organismo (ciò corrisponde a condizioni invernali nella maggior parte dei canili o allevamenti).

Una parte importante e spesso trascurata della gestione del canile o dell'allevamento è la corretta pulizia e disinfezione degli ambienti. Quando si ha a che fare con la brucellosi o altre malattie, la pulizia e la disinfezione servono a limitare la diffusione delle stesse e sono componenti fondamentali per la loro prevenzione. Pulizia e disinfezione corrette richiedono tempo e devono essere eseguite correttamente affinché un allevamento sia considerato veramente disinfettato. È importante ricordare che un canile pulito non è sempre un canile disinfettato. Il veterinario consulente deve essere certo che gli operatori comprendano a fondo l'intero processo di pulizia e disinfezione, compresa la corretta diluizione e conservazione dei detergenti e dei disinfettanti, nonché il fatto che sono assolutamente necessari il rispetto dei tempi di contatto previsti e un risciacquo adeguato. La frequenza richiesta per la pulizia e la disinfezione (giornaliera o settimanale) deve essere discussa a fondo con gli operatori. La struttura deve essere sempre pulita e disinfettata seguendo un ordine di recettività degli animali alle malattie, a partire innanzitutto dalle aree del canile che ospitano gli animali più sensibili (cuccioli e femmine in allattamento), seguite dalle aree che ospitano adulti sani e infine dalle aree che ospitano animali in cattivo stato di salute o in isolamento. (USDA, 2015)

Trattamento e ricollocamento degli animali positivi

Nei Paesi in cui la malattia è presente, nonostante l'infezione non esponga il paziente ad un rischio letale, in considerazione del fatto che la terapia antibiotica non garantisce la guarigione batteriologica del soggetto e che esso può rappresentare una fonte d'infezione sia per altri cani che per l'uomo, ne viene consigliata l'eutanasia, riservando eventualmente un tentativo di terapia esclusivamente ai riproduttori di pregio elevato (Carmichael, 1996). Tuttavia, anche se sono stati segnalati casi di trattamenti parzialmente riusciti, nessun trattamento si è rivelato efficace al 100% e i cuccioli nati da femmine con brucellosi cronica, se sopravvivono, spesso sono infetti. Per questo motivo, è essenziale che i cani positivi a i test diagnostici non vengano mantenuti come riproduttori, anche se hanno un alto valore genetico (Wanke, 2004).

Se il proprietario non intende ricorrere all'eutanasia, la terapia sarà consigliata fornendo fin dal principio le dovute informazioni sulle potenzialità zoonotiche della malattia, in special modo sottolineando che anche un soggetto sterilizzato e sottoposto a trattamento terapeutico specifico potrebbe ancora essere fonte di contagio per l'uomo (Feldman e Nelson, 1996).

È importante sottolineare che la brucellosi canina da *B. canis* non è attualmente considerata una malattia curabile nel cane. I tentativi di trattamento terapeutico hanno avuto risultati molto deludenti, con ricadute che si verificano comunemente. Il tentativo di trattamento può inoltre mascherare i risultati dei test diagnostici e ha dimostrato di essere un importante fattore che contribuisce alla diffusione della malattia. L'impatto di queste evidenze comporta per i proprietari di allevamenti di cani che gli animali infetti da una qualsiasi delle specie di *Brucella* devono essere rimossi dalla popolazione adibita alla riproduzione (USDA, 2015).

A causa del potenziale zoonotico di *Brucella*, i cani che hanno avuto conferma di positività alla Brucellosi non dovrebbero essere dati in adozione.

La decisione relativa alla possibile adozione dei cani positivi alla Brucellosi può essere presa solo con autorizzazione da parte delle Autorità Sanitarie competenti nell'area di origine e nell'area di destinazione (USDA, 2015). Se viene presa la decisione di autorizzare l'adozione di cani positivi alla Brucellosi, questi devono essere sottoposti a ovario-isterectomia o a castrazione, nonché ad appropriata terapia antibiotica di lungo termine, con un'adeguata supervisione da parte di un veterinario del Servizio Sanitario Nazionale competenti per area e territorio. Ciò dovrebbe includere test di laboratorio periodici

a vita per *B. canis*. La brucellosi canina è considerata un'infezione che potenzialmente dura tutta la vita e, anche dopo essere stati sottoposti a sterilizzazione chirurgica e uso di antibiotici a lungo termine, sia i cani maschi che le femmine possono continuare a eliminare il batterio in modo intermittente. I nuovi proprietari dovrebbero essere informati del rischio potenziale che questi cani possono rivestire durante il corso della loro vita per quanto riguarda l'infezione di uomo, altri cani e altre specie animali sensibili con cui entrano in contatto (USDA, 2015).

Formazione e informazione degli operatori

I veterinari del Servizio Sanitario Nazionale competenti per area e territorio o i veterinari liberi professionisti gestori di impianti di allevamento di cani che dovessero trovarsi a gestire un allevamento infetto da *B. canis* dovrebbero discutere approfonditamente con il personale addetto e i proprietari dell'allevamento di cani il potenziale di responsabilità legale (al di là danneggiamento della reputazione dell'allevamento) che inevitabilmente accompagnerebbe casi di zoonotici da *B. canis* che dovessero derivare dalla vendita di cuccioli o cani adulti infetti. Questi cuccioli o cani adulti entrano comunemente in contatto con bambini, anziani o altri soggetti che possono essere immunocompromessi (USDA, 2015). Esempio recente è stato un caso registrato a New York City nel 2012 nel quale è stata coinvolta una bambina di 3 anni, primo caso documentato di trasmissione di *B. canis* da un cucciolo a un bambino negli Stati Uniti (Dentinger *et al.*, 2015).

6. ASPETTI DI SANITA' PUBBLICA

La *B. canis* può causare malattia nell'uomo, che può acquisire l'infezione attraverso il contatto diretto con cani infetti, con le relative secrezioni della sfera riproduttiva, o col loro sangue (Lawaczek *et al.*, 2011; Lucero *et al.*, 2010).

Fonti d'infezione

Una potenziale fonte di diffusione di *B. canis* sono gli allevamenti di cani, sia per la natura della malattia, sia per il fatto che gli animali sono ospitati a stretto contatto tra di loro, sia per il costante movimento degli esemplari per la riproduzione o per la vendita (Brower *et al.*, 2007). Recenti focolai insorti negli Stati Uniti, in Ungheria, Svezia e Colombia evidenziano il legame tra focolai e movimento interregionale o internazionale di cani da riproduzione (Kaden *et al.*, 2014; Castrillón-Salazar *et al.*, 2013; Gyuranecz *et al.*, 2011, Brower *et al.*, 2007). La movimentazione non controllata di cani interi o cuccioli è ormai un noto fattore di rischio per la diffusione di malattie infettive e ha portato all'infezione umana da *B. canis* (Dentinger *et al.*, 2015; Brower *et al.*, 2007).

Rispetto ai cani di proprietà, è più probabile che i cani randagi siano interi e possano avere un livello più elevato di sieropositività a *B. canis* (Flores-Castro e Segura, 1976; Brown *et al.* 1976). Una alta incidenza di brucellosi canina nelle popolazioni di cani randagi / vaganti potrebbe portare a uno spillover nella popolazione umana in aree con un gran numero di cani randagi interi nel momento in cui questi cani vengono portati in canili rifugio o collocati in altro tipo di strutture in attesa di adozione. Negli Stati Uniti, il 30% dei cani da compagnia viene adottato da rifugi per animali e i test per *B. canis* non sono una procedura standard prima dell'adozione (Brower *et al.*, 2007). Tuttavia, non ci sono dimostrazioni di un legame diretto tra il numero di cani randagi fertili di un'area e il potenziale per l'esposizione all'uomo.

Altra potenziale fonte di diffusione di *B. canis* possono essere eventuali incidenti di laboratorio. *Brucella* spp. è considerato un patogeno ad alto rischio e la sua manipolazione richiede un laboratorio specializzato a livello 3 di biosicurezza (BSL 3), che se non utilizzato può comportare un'esposizione acquisita in laboratorio (Yagupsky e Baron, 2005). Dentinger *et al.* (2012) hanno descritto un incidente in cui 31 tecnici di laboratorio furono esposti a *B. canis* dopo aver maneggiato un batterio gram-negativo sconosciuto sul banco. Nessuno si è ammalato di malattia clinica, anche quelli classificati come aver avuto esposizioni ad alto rischio (secondo le linee guida del CDC) o che hanno rifiutato la profilassi post-esposizione (5 su 21 di quelli ad alto rischio) (Dentinger *et al.*, 2012). Un caso di esposizione acquisita in laboratorio è stato documentato in un tecnico che ha usato il pipettaggio orale per risospendere un ceppo in fase M di *B. canis*; il tecnico ha manifestato sintomi nonostante questo particolare ceppo fosse considerato avirulento nei cani (Wallach *et al.*, 2004).

Categorie a rischio

Il personale di laboratorio, i veterinari e i custodi degli animali sono le categorie a maggior rischio di esposizione a *B. canis* (Lucero *et al.*, 2010; Marzetti *et al.*, 2013; Krueger *et al.*, 2014).

Oltre a queste, diverse segnalazioni in letteratura evidenziano come possibili categorie a rischio i proprietari di cani da compagnia. (Swenson *et al.*, 1972; Munford *et al.*, 1975; Lucero *et al.*, 2010; Dentinger *et al.*, 2012; Tosi e Nelson, 1982). In particolare, i bambini e le persone immunodepresse avrebbero un rischio maggiore di contrarre la malattia (Dentinger *et al.*, 2012; Marzetti *et al.*, 2013; Tosi e Nelson, 1982; Lucero *et al.*, 2010). Sono stati segnalati tre casi in bambini di età inferiore a 4 anni (Dentinger *et al.*, 2012; Marzetti *et al.*, 2013; Tosi e Nelson, 1982). In una delle segnalazioni, Dentinger *et al.* (2012) hanno descritto la trasmissione di *B. canis* a un bambino da parte di un cucciolo infetto che era stato acquistato da un negozio di animali da compagnia ed era stato ritenuto sano durante la visita veterinaria preliminare. Il bambino ha manifestato febbre e l'infezione da *B. canis* gli è stata diagnosticata mediante emocoltura. I ceppi isolati dal bambino e dal cucciolo sono stati inviati al Centers for Disease Control and Prevention (CDC, USA) dove i due isolati hanno mostrato una stretta somiglianza genetica, suggerendo che il cucciolo era stata la fonte di infezione. Tuttavia, i segni clinici non si sono sviluppati in 4 adulti appartenenti alla stessa famiglia, tutti esposti al cucciolo. Diverse recenti segnalazioni di *B. canis* in pazienti con infezione da HIV evidenziano anche questa popolazione come a rischio (Lawaczek *et al.*, 2011; Lucero *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 1998). Questi casi di infezione da *B. canis* sono stati collegati al possesso di cani interi che avevano una anamnesi di insufficienza riproduttiva e una successiva diagnosi di infezione da *B. canis* tramite sierologia ed emocoltura (Lawaczek *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 1998).

Sintomatologia

I sintomi dell'infezione da *B. canis* nell'uomo sono generalmente simili a quelli della brucellosi causata dalle altre specie di *Brucella* (e.g. *B. abortus* o *B. melitensis*) (USDA, 2015). I sintomi sono spesso aspecifici e possono includere uno o più dei seguenti: febbre (spesso periodica e notturna), affaticamento, mal di testa, debolezza, malessere generale, nausea, brividi, sudorazione, dimagrimento, epatomegalia, splenomegalia e linfadenopatia (Swenson *et al.*, 1972; USDA, 2015). Le complicazioni, peraltro rare, possono essere rappresentate da endocardite, meningite, artrite e ascessi viscerali (Carmichael, 2012).

Sebbene ci siano in letteratura segnalazioni per le quali il decorso della malattia sarebbe comunque meno grave se paragonato all'infezione determinata dalle specie "classiche" del genere *Brucella* (Swenson *et al.*, 1972; Polt *et al.*, 1982), sono state tuttavia descritte anche manifestazioni gravi. Queste includono artrite settica, vegetazioni sulla valvola aortica, osteomielite, ascesso epidurale, versamento pleurico, lesioni orali, aneurismi degli arti inferiori e endocardite con coltura negativa (NASPHV, 2012).

Diagnosi

La diagnosi di infezione nell'uomo, così come per il cane, si basa sull'esame sierologico seguito dall'emocoltura. Tuttavia, nell'uomo, la diagnosi è spesso complicata a causa di segni e sintomi non specifici associati a un basso indice di sospetto della malattia da parte di molti medici. Se la malattia è posta in diagnosi differenziale, l'emocoltura è l'unico test disponibile per confermare l'infezione da *B. canis* nell'uomo. Tuttavia, la conferma non è semplice a causa della batteriemia intermittente e di basso livello (Rumley e Chapman, 1986). Per quanto concerne la sierologia, gli anticorpi umani anti *B. canis* reagiscono con gli stessi antigeni usati nelle prove sierologiche sul cane, mentre non reagiscono con l'antigene *B. abortus* (*Brucella abortus* strain 99, Weybridge oppure *B. abortus* strain 1119-3, USDA), che si usa nei test di routine per la diagnosi di brucellosi umana causata dalle specie di *Brucella* in fase liscia (Carmichael, 1990). Pertanto, anche se i medici dovessero sospettare la brucellosi, la diagnosi potrebbero essere non supportata dai test sierologici disponibili in commercio poiché questi sono indirizzati a rivelare gli anticorpi prodotti contro di *Brucella* in fase liscia e non rilevano anticorpi contro *B. canis* (Lucero *et al.*, 2005). I test sierologici per il rilievo d'infezione da *B. canis* sviluppati sui cani sono stati adattati per l'uso nell'uomo, ma i risultati dei test devono essere interpretati con cautela (Hensel *et al.*, 2018).

Terapia

A differenza di quanto si verifica nel cane, la malattia nell'uomo può essere rapidamente ed efficacemente trattata con una terapia a base di tetraciclina somministrata per due o tre settimane (Carmichael, 1990).

Profilassi

Nei Paesi in cui la malattia è presente si raccomanda ai veterinari di informare sempre i proprietari di soggetti infetti del potenziale rischio zoonosico che corrono nella convivenza col proprio animale da compagnia e di usare la massima cautela e igiene nel visitare cani sospetti di infezione, in primo luogo cagne che abbiano abortito (Carmichael, 2012).

Parimenti si raccomanda cautela in laboratorio nella manipolazione di campioni da sottoporre a test diagnostici per la ricerca di *B. canis* (Carmichael, 2012).

7. BIBLIOGRAFIA

Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E., 1975. Laboratory techniques in brucellosis, second ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Alton G. G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M., 1988: *Brucella canis*. In Techniques for the Brucellosis Laboratory, Ed. INRA, Paris, 169-185.

Badakhsh F.F., Carmichael L.E., Douglas J.A., 1982: Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. Journal of Clinical Microbiology; 15: 2, 286-289.

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. 57: 273-281.

Berthelot X., Garin-Bastuji B., 1993: Brucelloses canines. Le Point Vétérinaire; 25: 152, 125-129.

Brower A., Okwumabua O., Massengill C., Muenks Q., Vanderloo P., Duster M., Homb K., Kurth K., 2007. Investigation of the spread of *Brucella canis* via the U.S. interstate dog trade. Int J Infect Dis. 11: 454-458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2006.12.009>

Boeri E.J., Wanke M.M., Madariaga M.J., Teijeiro M.L., Elena S.A., Trangoni M.D., 2018. Comparison of four polymerase chain reaction assays for the detection of *Brucella* spp. in clinical samples from dogs, Veterinary World. 11: 201-208. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2018.201-208>

Brown J., Blue J.L., Wooley R.E., Dreesen D.W., 1976. *Brucella canis* infectivity rates in stray and pet dog populations. Am J Public Health. 66: 889-891. <http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.66.9.889>

Buonavoglia D., Malena G., Mosca R., Benchetti G., Narcisi D., Corsalini T., 1992: Ricerca di anticorpi per *Brucella canis* in sieri di cane. Atti SISVet; 1097-1101.

Carmichael L. E., 1990: *Brucella canis*. In Animal Brucellosis; Nielsen K. e Duncan J. R., Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 335-350.

Carmichael L. E., Bruner D. W., 1968: Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. Cornell Veterinarian; 58: 579-592.

Carmichael L. E., Joubert J. C., 1988: Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. Cornell Veterinarian; 78: 1, 63-73.

Carmichael L. E., Kenney R. .M., 1968. Canine abortion caused by *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc. 152: 605-616.

Carmichael L. E., Shin S. J., 1996: Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal); 11: 3, 161-165.

Carmichael L. E., Zoha S. J., Flores-Castro R., 1984: Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *B. canis*. Developments in Biological Standardization; 56: 371-383.

Carmichael L.E., 2012. Canine brucellosis. In: Greene C.E., editor. Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. London: Elsevier Health Sciences. 398-411.

Carmichael L.E., Bruner D.W., 1968. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortion. *Cornell Vet* 58: 579-92.

Carmichael L.E., Greene C.E., 2006. Canine brucellosis. In: Greene C.E., ed. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 369-381.

Casalinuovo F., Cacia A., Lopresti A., Miceli M. E., Viterbo A., Fenizia D., 1996: La brucellosi in Calabria. *Ricerca delle fonti di contagio. Veterinaria Italiana*; 32: 20, 23-28.

Castrillón-Salazar L., Giraldo-Echeverri C.A., Sánchez-Jiménez M.M., Olivera-Angel M., 2013. Factors associated with *Brucella canis* seropositivity in kennels of two regions of Antioquia, Colombia. *Cad Saude Publica*. 29: 1955 1973. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00133013>

CDC, Center for Disease Control, 1977. Brucellosis surveillance. Annual summary 1977.

CFSPH, The Center for Food Security and Public Health Canine Brucellosis; 2020. *Brucella canis* [monograph on the Internet]. Ames, Iowa.: Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf Accesso 12/06/2017.

Ciuchini F., Sala V., Pistoia C., Piccininno G., Pievaroli A., Fantini C., 1982: Brucellosi da *Brucella canis*: rilievi anticorpali su cani della città e del suburbio di Roma. *Clinica Veterinaria*; 105: 3, 138-144.

Colella G., Corsalini T., Goffredo G., 1980: Indagine sierologica sulla brucellosi del cane in Puglia e Basilicata. *Atti SISVet*; 34: 330-332.

Corbel, M. J., Brinkley-Morgan, W. J., 1989: Genus *Brucella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Vol. 1, Kreig N. R, e Holt S. D., Ed. Williams & Wilkins, Baltimora, 377-388.

Corrente M., Franchini D., Decaro N., Greco G., D'Abramo M., Greco M.F., Latronico F., Crovace A., Martella V., 2010. Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. *New Microbiologica* 33: 337-341.

Cosford K.L., 2018. *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *Can Vet J* 59: 74-81

Dentinger C.M., Jacob K., Lee L.V., Mendez H.A., Chotikanatis K., McDonough P.L., Chico D.M., De B.K., Tiller R.V., Traxler R.M., Campagnolo E.R., Schmitt D., Guerra M.A., Slavinski S.A., 2015. Human *Brucella canis* infection and subsequent laboratory exposures associated with a puppy, New York City, 2012. *Zoonoses Public Health* 62: 407-414. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12163>

Feldman E. C., Nelson R. W., 1996: Brucellosi. In *Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto*, Ed. UTET, Torino; 731-739.

Flores- Castro R., Carmichael L. E., 1981: *Brucella canis* infection in dogs. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*; 23: 75.

Flores-Castro R., Carmichael L.E., 1977. Canine brucellosis: current status of methods for diagnosis and treatment. In: 27th gainses veterinary symposium. 1977. p. 17-24.

Flores-Castro R., Segura R., 1976. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet*. 66: 347-352.

Fredrickson L.E., Barton C.E., 1974. A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. *J Am Vet Med Assoc* 165: 987-989.

GDA, Georgia Department of Agriculture, 2020. Canine Brucellosis (*Brucella canis*) [monograph on the Internet]. Atlanta, Georgia: Available from: http://agr.georgia.gov/Data/Sites/1/media/ag_animalindustry/animal_health/files/caninebrucellosis.pdf accesso 12/06/2020.

George L. W., Carmichael L. E., 1974: A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*; 35: 7, 905-909.

George L. W., Duncan J. R., Carmichael L. E., 1979: Semen examination in dogs with canine brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*; 40: 11, 1589-1595.

Gyuranecz M., Szeredi L., Rónai Z., Dénes B., Dencso L., Dán Á., Pálmai N., Hauser Z., Lami E., Makrai L., Erdélyi K., Jánosi S., 2011. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. *J Vet Diagn Invest*. 23: 143-147. <http://dx.doi.org/10.1177/104063871102300127>

Henderson R. A., Horlein B. F., Kramer T., Meyer M. E., 1974: Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. Journal of the American Veterinary Medical Association; 165: 5, 451-455.

Hensel M.E., Negron M., Arenas-Gamboa A.M., 2018. Brucellosis in Dogs and Public Health Risk. Emerging Infectious Diseases 24: 8. 1401-1406.

Hollett R.B., 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. Theriogenology 663: 575-587.

Hurov L., Troy G., Turnwald G., 1978. Diskospondylitis in the dog: 27 cases. J Am Vet Med Assoc. 173: 275-281.

Kaden R., Ågren J., Båverud V., Hallgren G., Ferrari S., Börjesson J., Lindberg M., Bäckman S., Wahab T., 2014. Brucellosis outbreak in a Swedish kennel in 2013: determination of genetic markers for source tracing. Vet Microbiol. 174: 523-530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.015>

Kang S.I., Lee S.E., Kim J.Y., Lee K., Kim J.W., Lee H.K., Sung S.R., Heo Y.R., Jung S.C., Her M., 2014. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014;37:237-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2014.07.003>

Kauffman L.K., Bjork J.K., Gallup J.M., Boggiatto P.M., Bellaire B.H., Petersen C.A., 2014. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. Zoonoses and Public Health. 61: 48-54. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12041>

Keid L.B., Soares R.M., Vasconcellos S.A., Megid J., Salgado V.R., Richtzenhain L.J., 2009. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture, and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. Res Vet Sci 86: 22-26.

Keid L.B., Soares R.M., Vieira N.R., Megid J., Salgado V.R., Vasconcellos S.A., da Costa M., Gregori F., Richtzenhain L.J., 2007. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. Vet Res Commun. 31: 951-965. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-006-0109-6>

Keid L.B., Soares R.M., Vasconcellos S.A., Megid J., Salgado V.R., Megid J., Richtzenhain L.J., 2010. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. Vet Rec 167: 96-99. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.c3811>

Kerwin S.C., Lewis D.D., Hribnik T.N., Partington B., Hosgood G., Eilts B.E., 1992. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). J Am Vet Med Assoc. 201: 1253-1257.

Kornegay J. N., 1983: Discospondylitis. In Current Veterinary Therapy VIII; Kirk R. W., Ed. WB Saunders Co., Philadelphia, 718-721.

Krueger W.S., Lucero N.E., Brower A., Heil G.L., Gray G.C., 2014. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. Zoonoses Public Health. 61: 509-518. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12102>

Lawaczek E., Toporek J., Cwikla J., Mathison B.A., 2011. *Brucella canis* in a HIV-infected patient. Zoonoses Public Health 58: 150-152. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01334.x>

López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzmán-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B., 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. Vet Microbiol 154: 152-155.

Lucero N.E., Corazza R., Almuzara M.N., Reynes E., Escobar G.I., Boeri E., Ayala S.M., 2010. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. Epidemiol Infect. 138: 280-285. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268809990525>

Lucero N.E., Escobar G.I., Ayala S.M., Jacob N., 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. J Med Microbiol. 54: 457-461. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45927-0>

Marzetti S., Carranza C., Roncallo M., Escobar G.I., Lucero N.E., 2013. Recent trends in human *Brucella canis* infection. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 36: 55-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.09.002>

Mateau de Antonio E.M., Martin M., Soler M., 1993. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. Am J Vet Res 54: 1043-1046.

Mol J.P.S., Guedes A.C.B., Eckstein C., Quintal A.P.N., Souza T.D., Mathias L.A., Haddad J.P.A., Paixão T.A., Santos R.L., 2020. Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 32: 77-86. <https://doi.org/10.1177/10406387198910>

Moore J.A., 1969. *Brucella canis* infection in dogs. J Am Vet Med Assoc. 155: 2034-2037.

Moreno S., Ariza J., Espinosa F.J., Podzamczar D., Miró J.M., Rivero A., Rodríguez-Zapata M., Arrizabalaga J., Mateos R. Herrero F., 1998. Brucellosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 17: 319-326. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01709454>

Munford R.S., Weaver R.E., Patton C., Feeley J.C., Feldman R.A., 1975. Human disease caused by *Brucella canis*. A clinical and epidemiologic study of two cases. JAMA. 231: 1267-1269. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1975.03240240037023>

NASPHV, National Association of State Public Health Veterinarians, 2012. Public Health Implications of *Brucella canis* Infections in Humans <http://www.nasphv.org/Documents/BrucellaCanisInHumans.pdf> (accesso 11/06/2020).

Nicoletti P., 1991: Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 13: 6, 944-947.

Nicoletti P., Chase A., 1987a: The use of antibiotics to control canine brucellosis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 9: 11, 1063-1066.

Nicoletti P., Chase A., 1987b: An evaluation of methods to diagnose *B. canis* in dogs. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 9: 11, 1071-1074.

Pollock R.V.H., 1979. Canine brucellosis: current status. Compend Contin Educ Pract Vet 1: 255-267.

Prosperi S., Ostanello F., Baldelli R., Falcone A., 1994: Ruolo del cane nella epidemiologia della Brucellosi ovi-caprina. Veterinaria Italiana; 30: 12, 2-6.

Reike J. A., Rhodes H. E., 1975; *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. Journal of the American Veterinary Medical Association; 165: 1734.

Rhoades H.E., Mesfin G.M., 1980. *Brucella canis* infection in a kennel. Vet Med/Small Anim Clin 1980; 595-599.

Rumley R.L., Chapman S.W., 1986. *Brucella canis*: an infectious cause of prolonged fever of undetermined origin. South Med J. 79: 626-628. <http://dx.doi.org/10.1097/00007611-198605000-00027>

Saegusa J., Ueda K., Goto Y., Fujiwara K., 1978: Ocular lesions in experimental canine brucellosis. Japanese Journal of Veterinary Science; 39: 181-185.

Serikawa T., Muraguchi T., 1979: Significance of urine in transmission of canine brucellosis. Japanese Journal of Veterinary Science; 41: 6, 607-616.

Smeak D. D., Olmstead M. L., Horn R. B., 1987: *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacement. Journal of the American Veterinary Medical Association; 191: 8, 986-990.

Swenson R.M., Carmichael L.E., Cundy K.R., 1972. Human infection with *Brucella canis*. Ann Intern Med. 76: 435-438. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-76-3-435>

Tolari F., Pizzirani S., 1978: Indagini preliminari sulla esistenza della brucellosi canina da *Brucella canis* in Italia. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa; 31: 107-113.

Tosi M.F., Nelson T.J., 1982. *Brucella canis* infection in a 17-month-old child successfully treated with moxalactam. J Pediatr. 101: 725-727. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(82\)80301-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(82)80301-6)

USDA, United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, 2015. Best Practices for *Brucella canis* Prevention and Control in Dog Breeding Facilities. https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/brucella_canis_prevention.pdf accesso in data 06/06/2020.

Valente C., Gialletti L., Capua I., Antognoni M. T., 1991: Brucellosi del cane. Indagine sierologica e batteriologica per *Brucella canis*. Archivio Veterinario Italiano; 42: 3, 135-139.

Vesco G., Caracappa V., Guercio V., 1987: Indagine sierologica nei confronti di *B. canis* in cani di affezione nella Sicilia occidentale. Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie; 39: 5, 450-451.

Wallach J.C., Giambartolomei G.H., Baldi P.C., Fossati C.A., 2004. Human infection with M- strain of *Brucella canis*. Emerg Infect Dis. 10: 146–148. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1001.020622>

Wanke M.M., 2004. Canine brucellosis. Animal Reproduction Science 82–83: 195–207

Weber A., Krauss H., 1977. Zum serologischen Nachweis von *Brucella canis*-Infektionen bei Hunden mittels Komplementbindungsreaktion. Zentralbl. Veterinarmed. 24B, 746–752.

Yagupsky P., Baron E.J., 2005. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. Emerg Infect Dis. 11: 1180–1185. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1108.041197>

Yu W.L., Nielsen K., 2010. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. Croat Med J 51: 306–313.

Zoha S. J., Carmichael L. E., 1982: Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *B. canis*. Veterinary Microbiology; 28: 1-4.

Zoha S. J., Walsh R., 1982: Effect of a two-stage antibiotic regimen in dogs naturally infected with *Brucella canis*. Journal of the American Veterinary Medical Association; 180: 1474.

ALLEGATO 1. Proposta di algoritmo diagnostico da utilizzare in allevamenti canini infetti da *B. canis*.

