

Brucelosis canina

Arduino¹, S.M.; Baruta¹, D.A.; Toso², R.E.

¹Cátedra Enfermedades Infecciosas, ²Cátedra Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

Resumen

La brucelosis canina causada por *Brucella canis* es una enfermedad infecciosa y contagiosa que afecta a los perros. Ha sido diagnosticada en EEUU y otros países, incluyendo Rusia, Japón, Nigeria, China y Argentina. La infección natural puede ocurrir por vía vertical u horizontal, a través de secreciones seminales o vaginales, y a través de mucosa oronasal y conjuntival. Los signos más significativos de la enfermedad en la hembra son el aborto y la falla reproductiva, en los machos la orquitis y la epididimitis seguidas de infertilidad. El diagnóstico se basa en el aislamiento de la bacteria a partir de hemocultivos y pruebas serológicas con antígeno específico de *Brucella canis*. El tratamiento es caro, prolongado, no es 100% efectivo y la infección usualmente recurre después del mismo. La transmisión de *Brucella canis* al hombre comúnmente ocurre por contacto directo con perros infectados, sus secreciones o a través de exposición directa en laboratorio. El contagio no es frecuente, pero cuando ocurre es fácilmente tratada.

Palabras clave: Brucelosis canina, *Brucella canis*

Summary

Canine brucellosis caused by *Brucella canis* is a contagious and infectious disease that affects dogs. It has been diagnosed in EEUU and several other countries, including Russia, Japan, Nigeria, India, China and Argentina. Natural infection can occur by vertical or horizontal route, by means of seminal or vaginal secretions and by oronasal and conjunctival mucous. The most significant sign of the disease is abortion and reproductive failure in females and orchitis and epididimitis followed by infertility in males. The diagnosis is based on isolation of the bacteria from hemoculture and serologic tests with specific antigens of *Brucella canis*. The treatment is expensive, extended and not 100% effective, and the infection often recurs after it. The transmission of *Brucella canis* to man commonly occurs through contact with infected dogs or their secretions or through direct laboratory exposure, but is not frequent and is easily treated.

Key words: Canine brucellosis, *Brucella canis*

Introducción

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, de curso sub- agudo o crónico. Produce infertilidad tanto en hembras como en machos, y por su naturaleza zoonótica presenta un riesgo sanitario para propietarios, criadores y demás personas que conviven con el animal infectado (Briseño González et al., 2004).

La brucelosis canina es causada específicamente por *Brucella canis*, aunque también puede ser ocasionada por *Brucella abortus*, *melitensis* y *suis* (Shin y Carmichael, 1999).

La enfermedad fue descrita por primera vez en EEUU en el año 1966, asociada a abortos y problemas reproductivos (Shin y Carmichael, 1999). En ese país se han realizado numerosas encuestas serológicas, arrojando como resultado una mayor incidencia de la misma en el sudeste de los EEUU (Ghoneim y Woods, 1984; Kerwin et al., 1992).

La distribución de esta patología es mundial. Se han realizado muestreos serológicos que llevaron al diagnóstico y caracterización de las cepas en lugares tan dispares como Rusia (Kulakov et al., 1997), Nigeria (Adesiyun et al., 1986), Trinidad (Brown et al., 1982), Italia (Ebani et al., 2003), Brasil (Larsson, 1980), México (Flores-Castro et al., 1977), Chile (Borie et al., 2002) y China (Barg et al., 1981).

En la República Argentina el primer aislamiento se realiza en el año 1978. En el año 1980, en la ciudad de Moreno de la Provincia de Buenos Aires, Myers y Varela-Díaz (1980) aislaron la bacteria como causa de enfermedad en perros callejeros. En el año 2003 se finaliza un trabajo de relevamiento seroepidemiológico en 1100 perros de la ciudad de General Pico, Provincia de La Pampa, dando como resultado una prevalencia en caninos del 5,27% utilizando la prueba de AGID (Baruta et al., 2003).

Agente etiológico

El género *Brucella* incluye seis especies denominadas primariamente sobre la base de la especificidad de la especie huésped. Las *Brucellas* son bacilos cocoides, pequeños, Gram negativos, sin cápsula, patógenos intracelulares facultativos.

Brucella canis es un cocobacilo de 0,5 a 0,7 μm de diámetro por 0,5 a 1,5 μm de longitud, inmóvil, no esporulado, aerobio estricto. Crece en agar sangre y agar tripticosa soya dando colonias rugosas, no requiere suero ni CO_2 para el crecimiento, no produce H_2S y es oxidasa y ureasa positivo (Larsson y da Costa, 1980; Soloaga et al., 2004).

Las cepas de campo de *Brucella canis* son siempre rugosas y tiene crecimiento de tipo mucosoide (M+) después de varios días de incubación, especialmente en medios con pH 7,2. Si la bacteria desarrolla en medios con pH menor a 6,5 se obtienen variantes M-. Estudios realizados en perros Beagles indican que las variantes M- tienen una virulencia reducida, ya que los animales se mantienen asintomáticos, a pesar de la inoculación de éstas por diversas vías, como

así tampoco se produce aborto o epididimitis. La respuesta inmune evaluada por test de aglutinación es mucho más débil, especialmente si se utiliza como antígeno (Ag) *Brucella ovis* (Carmichael et al., 1984a, b).

Posee antígenos citoplasmáticos y de pared celular. Carece del antígeno O del LPS, presente en cepas lisas. Los antígenos proteicos citoplasmáticos se han podido caracterizar por SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis) y análisis del polipéptido 35s. Estos polipéptidos son precipitados por el suero de perros infectados, y no por el de perros sanos o falsos positivos. Los polipéptidos más usualmente reconocidos en sueros de perros infectados con *Brucella canis* tiene un peso de 18, 22 y 68 kDa (Carmichael et al., 1989). Los antígenos de pared de las cepas de campo de *Brucella canis* M+ y sus variantes M- pueden ser responsables de la agregación bacteriana en caldos de cultivo acidificados y de la alta viscosidad de las colonias en agar a pH 6,8. En las cepas de campo en medio Buffer Fosfato Salino (PBS) y tratadas a 65°C se obtienen 2 Ag de pared: 2-R y 3-R, en tanto que en las variantes M- se obtienen por el mismo procedimiento 3 Ag: 2-S, 3A-S y 3B-S. En medio PBS y con tratamiento a 100°C se obtiene un antígeno adicional para cada variante, 1-R para M+ y 1-S para M-. Los Ag de pared de *Brucella canis* M+ son de menor tamaño, menor carga negativa y más hidrofóbicos que los de la variante M- (Zoha y Carmichael, 1982).

Brucella canis puede ser fácilmente distinguida de *Brucella suis*, *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* por la ausencia de quinovasamina en el LPS. El perfil de ácidos grasos también difiere en *Brucella canis* respecto a las otras tres especies (Fox et al., 1998). *Brucella canis* se distingue por la presencia de ácidos grasos de 19 carbonos (Dees et al., 1981). Los cultivos de *Brucella canis* y *ovis* pueden diferenciarse de otras *Brucellas* lisas mediante fagos R, R/O y R/C, en una dilución estandarizada de test de rutina (Corbel y Thomas, 1985).

Epizootiología

Los perros y otros cánidos son considerados los únicos huéspedes verdaderos de la *Brucella canis*, si bien ésta puede transmitirse al hombre y causarle enfermedad. La enfermedad puede transmitirse en forma horizontal o vertical, por la placenta o a través de la lactancia. Las infecciones naturales ocurren después de un apareamiento, por ingestión de restos placentarios o fetos abortados o por contacto directo con secreciones vaginales o seminales, a través de mucosa oronasal y conjuntival (Shin y Carmichael, 1999). Los machos infectados diseminan *Brucellas* al medio, pudiendo contaminar a machos susceptibles en un lapso de 4 a 6 meses, probablemente por contaminación de la orina con fluidos seminales (Carmichael y Joubert, 1988; Briseño González et al., 2004). La excreción de *Brucellas* comienza alrededor de 4 a 8 semanas posinfección y puede durar hasta un año y medio, en forma continua o intermitente (Serikawa et al., 1981).

Patogenia

La enfermedad comienza con la penetración de la bacteria a través de una membrana mucosa, ya sea oral, nasal conjuntival o genital, y luego es fagocitada por los macrófagos, (Wanke, 2004). La *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos debido a su capacidad de inhibir la formación del complejo fagolisosoma, con lo cual impiden la actuación de las enzimas lisosomales. Según Corbel y Thomas (1985), si bien se produce endocitosis a través de otras células blancas y hay degranulación y activación de otras células inmunes, *Brucella canis* resiste la acción del peróxido de hidrógeno del estallido respiratorio a partir de sus enzimas superóxido dismutasa y catalasa, que le permiten eliminar los radicales libres (Borie et al., 2002). A continuación se invaden los ganglios regionales, en los que se produce hiperplasia. Finalmente se propaga vía hematogena y linfática, la bacteriemia se produce entre 1 a 4 semanas post infección y puede mantenerse en forma intermitente o continua hasta 64 meses (Shin y Carmichael, 1999). Durante ese período la bacteria coloniza distintos órganos, tales como hígado, bazo, próstata y epidídimo, en los cuales provoca infiltración de células inflamatorias (Borie et al., 2002).

Signos clínicos y patológicos

Los síntomas más importantes de la enfermedad incluyen aborto tardío en las perras, epididimitis en machos, infertilidad en ambos sexos, linfadenitis generalizada, uveítis y discospondilitis (Wanke, 2004).

El aborto ocurre en el 75% de los casos entre los 45-55 días de gestación, en tanto que en el resto puede ocurrir aborto temprano, con expulsión o reabsorción. Esta última situación puede pasar desapercibida para el propietario, que solo nota una falla en la concepción (Shin y Carmichael, 1999) El aborto y la falla en la concepción son los signos más notorios en la hembra.

En diversos estudios se han descripto como signos reproductivos presentes en los machos: epididimitis, orquitis, degeneración testicular, infertilidad y dermatitis escrotal como los signos reproductivos presentes en los machos (Shin y Carmichael, 1999; Briseño González et al., 2004). Así mismo aparecen anomalías en las características del semen y eyaculado, tales como eyaculados sanguinolentos, falta de eyaculación, azoospermia o baja concentración y motilidad (Briseño González et al., 2004). Entre las anomalías que explican la infertilidad de los machos infectados se cuentan células espermáticas inmaduras, retención de gota citoplasmática proximal, colas enrolladas, aglutinación cabeza-cabeza y desprendimiento de cabezas (Borie et al., 2002). Briseño et al. (2004) asocian la falta de eyaculación a que la orquitis y epididimitis producen inflamación, dolor o fibrosis que impide la eyaculación, lo que también explicaría la azoospermia (Briseño González et al., 2004). A través del análisis

histológico se comprueba que en perros azoospermicos la espermatogénesis está alterada en los túbulos seminíferos, encontrándose que en general sólo avanza hasta espermatocitos primarios, sin presencia de espermátidas ni espermatozoides. También se describe presencia de glóbulos rojos en el lumen y hemosiderófagos en los túbulos seminíferos, lo que indicaría alteración de la barrera hematotesticular (Borie et al., 2002).

Entre los signos y lesiones no reproductivos asociados a la enfermedad los hallazgos más comunes fueron discoespondilitis, uveítis anterior y artritis (Briseño González et al., 2004). En algunos casos la pesquisa serológica en ciertas zonas de EEUU comenzó precisamente tomando como población de estudio a aquellos perros con discoespondilitis (Kerwin et al., 1991).

Otras citas bibliográficas hacen referencia a osteomielitis posteriores a cirugías de reemplazo de cadera. La osteomielitis fue diagnosticada en todos los casos mediante radiología, rodeando el reemplazo entre 9 a 16 meses después de la cirugía y en todos los casos los perros no presentaban síntomas de la enfermedad, aunque se conocía que había ocurrido contacto con el agente etiológico (Smeak et al., 1987).

Respuesta Inmunitaria

Los anticuerpos se hacen detectables a partir de las dos semanas postinfección (Johnson et al., 1983). La respuesta inmune es más débil y de menor duración con la exposición a cepas M- que con la exposición a cepas de campo M+ en los tests de aglutinación, especialmente cuando se usa como antígeno *Brucella ovis* (Carmichael et al., 1989).

La alteración de la barrera hematotesticular implica que determinantes antigénicos espermáticos pasen a la circulación periférica, desencadenando una respuesta autoinmune del animal. Este hecho explica la autosensibilización del animal enfermo, aparición de anticuerpos antiespermáticos y reacciones de hipersensibilidad tardía, además de perpetuar la orquitis y epididimitis y mantener la azoospermia (Borie et al., 2002). De esta manera, los perros infectados con *Brucella canis* luego de 3 meses desarrollan anticuerpos séricos que aglutinan los esperematozoides caninos. También han sido observados anticuerpos en plasma seminal de perros infectados en forma crónica. El plasma seminal de perros infectados contiene un factor citofílico para los macrófagos esplénicos normales que causa la adherencia del espermatozoides a los macrófagos. Además, los perros con bacteriemia mayor a 4 meses presentan una reacción de hipersensibilidad retardada ante extractos solubles de testículo canino. En los perros infectados que presentan atrofia testicular la respuesta es más severa (George y Carmichael, 1984).

Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio de brucelosis canina incluye las pruebas de aglutinación rápida en placa (ARP), aglutinación rápida en tubo (RSAT) e inmunodifusión en gel de agar (AGID). Estas tres pruebas tienen una cierta falta de especificidad dado que los Ag de superficie de *Brucellas* rugosas reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos producidos por otras especies de bacterias no patógenas (Shin y Carmichael, 1999). Debido a esto se han refinado técnicas, implementándose una prueba RSAT utilizando un antígeno M-, un AGID que utiliza antígenos proteínicos citoplasmáticos y pruebas de ELISA e IFI. El hemocultivo sigue siendo el método recomendado antes de declarar al animal infectado, pero como la bacteriemia puede ser intermitente un cultivo negativo no puede usarse como criterio para excluir una infección por *Brucella canis* (Flores-Castro et al., 1977; Shin y Carmichael, 1999; Lucero et al., 2002; Ebani et al., 2003; Miranda y Baez, 2005).

El uso de un antígeno proveniente de una variante M- de *Brucella canis* en reemplazo del antígeno de *Brucella ovis* reduce la tasa de falsos positivos a un 10%. El antígeno M- teñido con Rosa de Bengala es levemente más sensible que los antígenos comerciales de *Brucella ovis*. En ambos casos el suero problema debe tratarse primero durante 1 minuto con 2 mercaptoetanol (Carmichael y Joubert, 1987).

En la prueba de AGID, la modificación tendiente a disminuir los falsos positivos consiste en utilizar un complejo antigénico con al menos 3 antígenos incluyendo el 2-R, el cual no está presente en ninguna otra bacteria Gram negativo (Carmichael et al., 1984b).

El ELISA indirecto propuesto como diagnóstico se aconseja para estudiar los sueros positivos a RSAT, como una prueba complementaria después de ésta, aumentando la especificidad. Detecta IgA e IgG, permitiendo evaluar el estado clínico del animal (Serikawa et al., 1989; Lucero et al., 2002). Otros autores citan el uso de ELISA indirecto utilizando como antígeno un lipopolisacárido rugoso (RLPS) obtenido de un cultivo de *Brucella canis*, lográndose en este caso una especificidad del 98,8% y sensibilidad del 95,8% (Nielsen et al., 2004).

Tratamiento

El tratamiento en general es caro, difícilmente exitoso y se recomienda sólo en aquellos animales que puedan ser monitoreados durante y después del tratamiento (Shin y Carmichael, 1999). Aún no se ha encontrado una antibioticoterapia totalmente efectiva para la erradicación de la bacteria (Wanke et al., 2006). La reaparición de la enfermedad después de la cesación del tratamiento es común.

Estreptomina, doxiciclina y rifampicina son las principales drogas para el tratamiento de la brucelosis. Debido a las recidivas después de la finalización del tratamiento se han utilizado combinaciones antibióticas que generalmente incluyen doxiciclina con estreptomina o

rifampicina durante 6 semanas. También pueden incorporarse gentamicina o metilmicina como alternativas a la estreptomina (Maurin y Raoult, 2001).

Mateu-de-Antonio y Martín (1995) ensayaron in vitro la eficacia de tetraciclinas, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, rifampicina, macrólidos y sus combinaciones contra *Brucella canis*. Las tetraciclinas se mostraron como los antibióticos con menores concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), las quinolonas tuvieron una buena respuesta, en tanto que se observó resistencia a los macrólidos. También se demostró una sinergia moderada para tetraciclinas y aminoglucósidos, mientras que la combinación más sinérgica fue la de enrofloxacin y estreptomina (Mateu-de-Antonio y Martin, 1995).

Se han ensayado numerosos tratamientos in vivo con combinaciones de drogas y por lapsos variables de tiempo. Johnson et al. (1982) ensayaron terapias combinadas con tetraciclina, dihidroestreptomina y sulfa trimetroprima, encontrando que las perras tratadas se mantenían abacteriémicas entre 3 meses y 1 año post tratamiento. Los estudios realizados por Wanke et al. (2006) para evaluar la eficacia de la enrofloxacin en el tratamiento de perras infectadas en diferentes estadios del ciclo sexual, administrada en forma oral cada 12 horas durante 30 días a razón de 5 mg/Kg mostraron que posterior al mismo, las perras se mantuvieron negativas a la prueba de RSAT durante 14 meses, tiempo que duró el estudio.

Control

No ha habido resultados exitosos referidos al desarrollo de vacunas efectivas para proteger contra la enfermedad y que no interfieran en el diagnóstico. En los criaderos se debe tener como norma de control el testeo serológico de rutina y la eliminación de animales infectados, además del control serológico previo a la introducción de un animal nuevo al establecimiento. Se sugiere para los criaderos 2 pruebas serológicas negativas con 4-6 semanas de intervalo para permitir el ingreso de un animal al grupo de reproducción. Las hembras usualmente deben monitorearse antes del celo (Shin y Carmichael, 1999).

Salud pública

El hombre es susceptible a la infección por *Brucella canis*, aunque no es frecuente. Habitualmente se trata de casos leves con buena respuesta al tratamiento. La infección natural generalmente es consecuencia del contacto con perros infectados y más raramente de accidentes de laboratorio (Polt et al., 1982; Shin y Carmichael, 1999).

Dentro de los casos descriptos en la bibliografía la sintomatología y lesiones incluyen fiebre, murmullo cardíaco y pérdida de peso, vegetaciones aórticas e insuficiencia aórtica severa

asociadas a endocarditis, fiebre de origen desconocido (Rumley y Chapman, 1986), anginas a repetición, dolor en articulaciones, adenomegalias y esplenomegalia (Soloaga et al., 2004).

Para el diagnóstico se pueden utilizar las mismas pruebas descriptas anteriormente (Larsson, 1980; Barg et al., 1981; Diker et al., 1984; Zamora y Alonso, 1987; Jian, 1992; Lucero et al., 2005). El hemocultivo también se considera una prueba de suma utilidad (Soloaga et al., 2004). Inicialmente se utilizó una prueba de microaglutinación la cual usaba como antígeno *Brucella canis* muertas y teñidas con safranina (Polt y Schaefer, 1982). Más recientemente evaluaciones de distintos métodos demostraron una excelente sensibilidad y especificidad para el ELISA indirecto (Lucero et al., 2005). También se ha propuesto utilizar los perfiles de carbohidratos de *Brucella canis* y PCR a fin de diferenciar ésta de otros microorganismos Gram negativos con los que podría haber reacción cruzada (Fox et al., 1998).

Los tratamientos ensayados y que fueron exitosos incluyeron el uso de vancomicina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftriaxona, combinaciones de doxiciclina con estreptomina o rifampicina (Ying et al., 1999; Soloaga et al., 2004), cotrimoxazole y estreptomina (Schoenemann et al., 1986).

Investigación de nuevos compuestos con actividad sobre *Brucella canis*

Ya se mencionó que el tratamiento con antibióticos de la brucelosis canina no resulta enteramente efectivo. Se han probado diferentes compuestos activos administrados solos o asociados. Sin embargo, aún cuando se lograron buenos resultados in vitro, no logran eliminar definitivamente las brucelas de los caninos. Moore (1970) indicó que la baja efectividad in vivo podría ocurrir como consecuencia de la localización intracelular de la bacteria, pero hasta la fecha no se han descubierto nuevas drogas o diseñado formulaciones que permitan tratamientos efectivos con los compuestos conocidos. Este hecho, que provoca pérdidas económicas en los criaderos ya que deben eliminarse los animales positivos y a los dueños de animales de compañía que deben afrontar largos y costosos tratamientos, determina un especial interés en la investigación de nuevos compuestos con actividad sobre *Brucella canis*.

En el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, se están realizando estudios para determinar el grado de actividad antimicrobiana sobre cepas de *Brucella canis* in vitro de extractos vegetales obtenidos a partir de plantas nativas o naturalizadas de la Provincia de La Pampa. Teniendo en cuenta que la mayoría de los fármacos que se utilizan en la actualidad son copias sintéticas de compuestos naturales aislados de las plantas (Alonso, 2001), se considera una fuente promisoría para hallar principios activos que superen el desempeño farmacológico de los compuestos utilizados en la actualidad. Recientemente se han identificado plantas que mostraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de cultivos de *Brucella canis*. Los alcances

de estos estudios permitirán identificar las plantas con mayor actividad con el fin de ensayar la efectividad in vivo en estudios posteriores.

Bibliografía

Adesiyun, A. A.; Abdullahi, S. U.; Adeyanju, J. B. 1986. Prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella canis* antibodies in dogs in Nigeria. *Journal of Small Animal Practice*, 27: 31-37.

Alonso, J. R. 2001. Tratado de Fitomedicina. Ed. ISIS Ediciones SRL. p. 34.

Barg, L.; de Godoy, A. M.; Passos, E. B. 1981. Investigation of agglutinins for *Brucella abortus* and *Brucella canis* in human sera from Bahia-Brazil. *Arquivos da Escola Veterinaria*, 33: 43-50.

Baruta, D. A.; Ardoino, S. M.; Brandan, J. L.; Riesco, S.; Oriani, D. S.; Mariano, E. L. 2003. Estudio Seroepidemiológico de Brucelosis Canina en General Pico, Provincia de La Pampa, Argentina. *InVet*, 5: 11-16.

Borie, C.; Cepeda, R.; Villarroel, M.; De Los Reyes M. 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34: 111-116.

Briseño González, H.; Páramo Ramírez, R. M.; Flores Castro, R.; Suárez Güemes, F. 2004. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Veterinaria México*, 35: 121-128.

Brown, J.; Dreesen, D. W.; Wooley, R. E.; Blue, J. L.; Shotts, E. B., Jr. 1982. Serosurvey for *Brucella canis* antibodies in stray dogs of North Georgia and Port of Spain, Trinidad. *Caribbean Journal of Science*, 17: 95-105.

Carmichael, L. E.; Joubert, J. C. 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Veterinary*, 77: 3-12.

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

Carmichael, L. E.; Joubert, J. C.; Jones, L. 1989. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Veterinary Microbiology*, 19: 373-387.

Carmichael, L. E., Zoha, S. J., Flores-Castro, R. 1984a. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Developments in Biological Standardization*, 56: 649-656.

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

- Corbel, M. J.; Thomas, E. L.** 1985. Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Research in Veterinary Sciences*, 38: 35-40.
- Dees, S. B.; Hollis, D. G.; Weaver, R. E.; Moss, C. W.** 1981. Cellular fatty acids of *Brucella canis* and *Brucella suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 14: 111-112.
- Diker, S.; Istanbuluoglu, E.; Ayhan, H., Soysal, G.** 1984. A serologic study of human *Brucella canis* infections in the bursa region. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 18: 203-207.
- Ebani, V. V.; Cerri, D.; Fratini, F.; Bey, R. F.; Andreani, E.** 2003. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiologica*, 26: 65-73.
- Flores-Castro, R.; Suárez, F.; Ramírez-Pfeiffer, C.; Carmichael, L. E.** 1977. Canine Brucellosis: Bacteriological and Serological Investigation of Naturally Infected Dogs in Mexico City. *Journal of Clinical Microbiology*, 6: 591-597.
- Fox, K. F.; Fox, A.; Nagpal, M.; Steinberg, P.; Heroux, K.** 1998. Identification of *Brucella* by Ribosomal-Spacer-Region PCR and Differentiation of *Brucella canis* from Other *Brucella* spp. Pathogenic for Humans by Carbohydrate Profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3217-3222.
- George, L.; Carmichael, L.** 1984. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. *American Journal of Veterinary Research*, 45: 274-281.
- Ghoneim, N. H.; Woods, G. T.** 1984. Serological epidemiology of *Brucella canis* in a hospitalized and referral population of dogs and cats in Illinois. *Canine Practice*, 11: 17-29.
- Jian, H.** 1992. Identification and characterisation of 200 strains of *Brucella canis* under test from China. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 32: 370-375.
- Johnson, C. A.; Bennett, M.; Jensen, R. K.; Schirmer, R.** 1982. Effect of combined antibiotic therapy on fertility in brood bitches infected with *Brucella canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180: 1330-1333.
- Johnson, C. A.; Bull, R. W.; Schirmer, R. G.** 1983. Peripheral lymphocyte function in dogs with *Brucella canis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 4: 425-431.
- Kerwin, S. C.; Lewis, D. D.; Hribernik, T. N.; Partington, B.; Hosgood, G.; Eilts, B. E.** 1992. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201: 1253-1257.
- Kulakov, I. K.; Zheludkov, M. M.; Dranovskaia, E. A.; Skavronskaia, A. G.** 1997. Comparative study of the antigenic composition of *Brucella canis* strains by immunoblotting. *Molekuliarnaia Genetika Mikrobiologiia Virusologiia*, 3: 15-17.
- Larsson, M. H. M. A.** 1980. Pesquisa de aglutininas anti *Brucella canis* em soros humanos na cidade de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 14: 404-407.
- Larsson, M. H. M. A.; da Costa, E. O.** 1980. Isolation of *Brucella canis*. *International Journal of Zoonoses*, 7: 125-130.

- Lucero, N. E.; Escobar, G. I.; Ayala, S. M.; Lopez, G.** 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *Journal of Medical Microbiology*, 51: 656-660.
- Lucero, N. E.; Escobar, G. I.; Ayala, S. M.; Jacob, N.** 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 457-461.
- Mateu-de Antonio, E. M.; Martin, M.** 1995. In vitro efficacy of several antimicrobial combination against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Veterinary Microbiology*, 45: 1-10.
- Maurin, M.; Raoult, D.** 2001. Use of Aminoglycosides in Treatment of Infections Due to Intracellular Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2977-2986.
- Miranda, A. O.; Báez, E. N.** 2005. Serodiagnóstico en Brucelosis Canina: Análisis comparativo entre las técnicas de aglutinación rápida en placa e inmunodifusión en gel de agar. XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas 2005 85° Aniversario. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste. p. 67.
- Moore, J.** 1970. Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 156: 12-15.
- Myers, D. M.; Varela-Diaz, V. M.** 1980. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. *Cornell Veterinary*, 70: 258-265.
- Nielsen, K.; Smith, P.; Conde, S.; Draghi de Benitez, G.; Gall, D.; Halbert, G.; Kenny, K.; Massengill, C.; Muenks, Q.; Rojas, X.; Perez, B.; Samartino, L.; Silva, P.; Toilersrud, T.; Jolley, M.** 2004. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 25: 171-182.
- Polt, S. S.; Dismukes, W. E.; Flint, A.; Schaefer, J.** 1982. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. *Annals of Internal Medicine*, 97: 717-719.
- Polt, S. S.; Schaefer, J.** 1982. A microagglutination test for human *Brucella canis* antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, 77: 740-744.
- Rumley, R. L.; Chapman, S. W.** 1986. *Brucella canis*: an infectious cause of prolonged fever of undetermined origin. *Southern Medical Journal*, 79: 626-628.
- Serikawa, T.; Iwaki, S.; Mori, M.; Muraguchi, T.; Yamada, J.** 1989. Purification of a *Brucella canis* cell wall antigen by using immunosorbent columns and use of the antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 837-842.

- Serikawa, T.; Muraguchi, T.; Yamada, J.; Takada, H.** 1981. Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs. *Jikken Dobutsu. Experimental Animals*, 30: 7-14.
- Schoenemann, J.; Luticken, R.; Scheibner, E.** 1986. *Brucella canis* infection in man. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 111: 20-22.
- Shin, S. J.; Carmichael, L.** 1999. Canine Brucellosis caused by *Brucella canis* in Recent Advances in Canine Infectious Diseases. L. Carmichael Ed. IVIS Ithaca NY (www.ivis.org) A0101.1199.
- Smeak, D. D.; Olmstead, M. L.; Hohn, R. B.** 1987. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191: 986-990.
- Soloaga, R.; Salinas, A.; Poterallo, M.; Margari, A.; Suar, B.; Lucero, N.; Almuzaea M.** 2004. Bacteriemia por *Brucella canis*: Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Revista Argentina de Microbiología*, 36: 81-84.
- Wanke, M. M.** 2004. Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 195-207.
- Wanke, M. M.; Delpino, M. V.; Baldi, P. C.** 2006. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). *Theriogenology*, 11: 34-57.
- Ying, W.; Nguyen, M. Q.; Jahre, J. A.** 1999. *Brucella canis* endocarditis: case report. *Clinical Infectious Diseases*, 29: 1593-1594.
- Zamora, J.; Alonso, O.** 1987. Detection of *Brucella canis* antibody in man. *Revista Médica de Chile*, 115: 126-128.
- Zoha, S. J.; Carmichael, L. E.** 1982. Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity. *American Journal of Veterinary Research*, 43: 171-174.