

BRUCELOSIS EN HEMBRAS CANINAS EN MONTERÍA (COLOMBIA): UN PROBLEMA PARA LA SALUD PÚBLICA

Juan Carlos Ballut¹
Alfonso Calderón²
Virginia Rodríguez³

RESUMEN

La brucelosis canina producida por la cepa rugosa *Brucella canis*, constituye un riesgo para la salud pública. Debido a que produce infertilidad en ambos sexos; en hembras: abortos tardíos, reabsorciones embrionarias, muertes embrionarias, descargas vaginales de color y olor desagradables y nacimiento de cachorros débiles; en machos: epididimitis, orquitis, atrofia testicular, anormalidades espermáticas; así como puede causar enfermedad en humanos. Mediante un estudio epidemiológico descriptivo de corte transversal y mediante el cálculo para poblaciones, se seleccionaron 62 hembras caninas adultas de diferentes áreas urbanas de Montería (Córdoba) para determinar anticuerpos contra *B. canis*. Se usó una prueba inmunoensayo cromatográfico de fase sólida comercial. Se elaboró una base de datos en formato Excel en la que se registraron datos anamnésicos y los resultados de laboratorio. Se empleó estadística descriptiva. La seroprevalencia de *B. canis* fue del 6,45%. El 88,71% de las hembras tuvo historia reproductiva normal y el 11,29% se clasificó como anormal por el reporte de abortos y reabsorciones embrionarias. El 4,84% de las hembras con historial normal fueron seroprevalentes, mientras el historial del 1,61% de las seroprevalentes para *B. canis* tuvo historial reproductivo anormal. La seroprevalencia determinada en hembras caninas hace pensar

que se debe tener presente esta enfermedad para su correcto diagnóstico, y la presencia de serorretores es una evidencia y un riesgo epidemiológico para la salud pública.

Palabras clave: *Brucella canis*, anticuerpos, estudios seroepidemiológicos.

BRUCELOSIS IN FEMALE DOGS IN MONTERIA (COLOMBIA): A PUBLIC HEALTH PROBLEM

ABSTRACT

Canine brucellosis caused by the rough strain of *Brucella canis*, constitutes a risk to public health because it produces infertility in both sexes; in female it causes late-term abortions, embryo resorption, embryonic death, vaginal discharges with unpleasant colors and odors, weak newborn puppies; in males it causes epididymitis, orchitis, testicular atrophy and sperm abnormalities; it can also cause illness in humans. Through a descriptive cross section epidemiological study and by calculation for populations, 62 adult canine females of different urban areas of Montería (Córdoba) were selected to determine antibodies against *B. canis*, using a commercial chromatographic immunoassay test in solid phase. An Excel database format was developed in order to

¹ MVZ. M.Sc. Profesor Titular, Grupo Medicina y Cirugía Veterinaria, Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba.

² MVZ. M.Sc. Profesor Titular, Grupo Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico Asociado, Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, sede Berástegui, km 26 vía Ciénaga de Oro. Montería, Córdoba, Colombia.

Autor para correspondencia: alcaran1@yahoo.com

³ Bacterióloga. Profesora Asociada, Grupo Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba

register anamnestic data and laboratory results. In addition, descriptive statistics was employed in this study. The results of this study show that *B. canis* seroprevalence was 6.45%; 88.71% of the female's reproductive histories was normal; and 11.29% were classified as abnormal by the report of abortions and embryonic resorption; 4.84% of the females with normal reproductive history were seroprevalent while 1.61% of the seroprevalent for *B. canis* had an abnormal

reproductive history. The seroprevalence determined in females dogs suggests that this disease must be considered for its correct diagnosis and the presence of seroreactants is an evidence and an epidemiological risk for public health.

Key words: antibodies, *Brucella canis*, seroepidemiological studies.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis canina producida por *Brucella canis* es un bacilo corto Gram negativo intracelular facultativo y clasificada como cepa rugosa o mucoide de acuerdo con el aspecto de las colonias en medio sólido (1, 2), ocasiona fallas reproductivas como abortos tardíos en hembras preñadas que ocurren de 45 a 55 días de gestación; seguidamente hay descargas vaginales o muertes embrionarias tempranas y reabsorción unas semanas después del apareamiento; nacimiento de cachorros débiles que mueren después del nacimiento; en los machos hay epididimitis, orquitis y anomalías espermáticas (3). Los caninos también pueden ser afectados por especies lisas de *Brucella*, por ejemplo, se determinó seropositividad en tres caninos en Corea y donde la fuente de infección fueron los bovinos de donde se aisló *B. abortus* (4). También *B. melitensis* (5) y *B. suis* (6) han sido reportados en caninos; aunque no se ha comprobado infección por *B. ovis* y *B. neotomae* (1). Los caninos son los hospederos naturales de *B. canis* (1) y el agente etiológico por vía horizontal, vertical o iatrogénica, afecta al humano (7-9). Se reconocen los beneficios de la tenencia de mascotas en pacientes inmunosuprimidos, sin embargo es un riesgo potencial de zoonosis *B. canis* (10, 11).

Se ha aislado *B. canis* en pacientes con fiebre de quince días de evolución (12). En Suecia, se diagnosticó un niño infectado por *B. canis* (13). En Argentina, la brucelosis en humanos por *B. canis* está subdiagnosticada por la carencia de pruebas

serológicas confiables y por desconocimiento de su prevalencia, se propone que pacientes negativos a las pruebas de antígenos lisos sean diagnosticados por la prueba de aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT), un ELISA indirecto (IELISA) como pruebas diagnósticas confirmatorias de *B. canis* en humanos (7, 14, 15). En donantes sanos de bancos de sangre humano se han reportado seroprevalencias por *B. canis*, por ejemplo en Perú del 0,2% en el 2007 (16), del 1,6% en Turquía y negativos para *B. abortus* en 2011 (17).

El aislamiento por hemocultivo o cultivo sólido es el *gold standard* para declarar un animal como infectado; además permite la biotipificación (18-20), pero la bacteremia puede ser intermitente y un cultivo negativo no es criterio para excluir una infección por *B. canis* (7, 21, 22).

Las pruebas serológicas emplean bacterias inactivadas o fracciones purificadas como antígenos para la detección de anticuerpos generados por el hospedero durante la infección; este diagnóstico incluye el test de aglutinación (SAT), la prueba de aglutinación rápida en placa (ARP), aglutinación rápida en tubo (RSAT) e inmunodifusión en gel de agar (AGID), Elisa indirecta (IELISA) (3, 20, 21).

Mediante métodos serológicos y un PCR-T se ha diagnosticado *B. canis*, esta combinación de técnicas de diagnóstico permitió evidenciar la circulación de *B. canis* en Italia (23). Actualmente se propone un diagnóstico a partir de frotis

vaginal y muestras de orina con técnicas moleculares con el fin de detectar *B. canis* antes de la detección de anticuerpos (24). En Colombia hay pocos estudios sobre la epidemiología de la brucelosis canina y no existen leyes sanitarias que la regulen (25). El objetivo general de este estudio fue determinar anticuerpos contra *B. canis* en hembras caninas urbanas de Montería (Córdoba), mediante un ensayo inmunocromatográfico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Se implementó un estudio epidemiológico descriptivo de corte transversal en diferentes áreas urbanas de Montería.

Zona de estudio

Las muestras se tomaron en Montería, capital del departamento de Córdoba, localizada a los 08°45'27" de latitud Norte y 75°53'24" de longitud Oeste, con una altura de 18 msnm, con una humedad relativa del 85% y una temperatura promedio de 28°C.

Selección de la muestra

Según el censo de vacunación en la zona urbana de Montería, se vacunaron 12.364 caninos contra la rabia, de los cuales 5.128 fueron hembras (26); mediante el cálculo para poblaciones (27), se estableció que el tamaño de la muestra para determinar la seroprevalencia de anticuerpos por *B. canis*, fue de 62 hembras caninas, que se tomaron en los diferentes barrios, teniendo en cuenta el porcentaje de participación, el promedio de hembras por barrio y número de barrios.

Toma de las muestras

A cada hembra se le realizó un examen clínico, donde se preguntó su historial reproductivo con el fin de catalogarlo como normal o anormal;

se consideró anormal cuando hubo reporte de abortos, nacimiento de cachorros débiles, copulación normal sin preñez posterior, camadas pequeñas, ciclos demasiado frecuentes.

Posteriormente, previa desinfección de la vena cefálica o safena, se tomó una muestra de sangre de 5 ml en un tubo vacutainer sin anticoagulante al vacío (tapa roja); cada muestra se rotuló con la respectiva identificación del animal y se conservó en refrigeración 4°C en una nevera de icopor, hasta el laboratorio de la Clínica Julio E. Cuervo de la Universidad de Córdoba, sede Berástegui, donde se obtuvo el suero por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, el cual se conservó en congelación (-70°C) en tubos *eppendorf* hasta su procesamiento.

Pruebas serológicas

Se empleó una prueba comercial Antigen Rapid C Brucella Ab Test Kit o ensayo inmunocromatográfico en fase sólida para la determinación de *B. canis*, siguiendo las especificaciones de la casa fabricante del kit; los sueros se descongelaron y a temperatura ambiente se tomó una muestra de suero de 20 µl al pozo del dispositivo, se agregó 160 µl del *buffer* diluyente en el mismo pozo y se leyó la prueba a los 20 minutos. Cuando apareció una banda de color púrpura en el control del ensayo, se evidenció una correcta ejecución de la prueba junto a otra banda que indica un resultado positivo para anticuerpos contra *B. canis* de la muestra problema; si esta banda no aparece el resultado es negativo. Esta prueba comercial presentó una sensibilidad y especificidad mayor o igual al 90% cuando se comparó con una prueba rápida de aglutinación en lámina 2-mercapto-etanol (28).

Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos en formato Excel, donde se consignó información de las variables de los caninos evaluados y los resultados obtenidos en el laboratorio. Se usó Chi-cuadrado,

con el objeto de determinar si las variables edad, raza e historia clínica eran independientes con la seropositividad a *B. canis*; se usó estadística descriptiva mediante el software SAS (29).

Aspectos éticos

El Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT) de la Universidad de Córdoba, clasificó este estudio de bajo riesgo. Las muestras fueron tomadas por estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, supervisado por uno de los autores; quienes tuvieron en cuenta, para los procedimientos

de toma de muestra, manejo y conservación, las normas éticas, técnicas, científicas y administrativas para la investigación, en animales según la Ley 84 (30). A lo largo del estudio, se mantuvo la confidencialidad de la información de caninos muestreados y seropositivos.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta la población de hembras evaluadas por edad y la seroprevalencia de *B. canis* por edad en Montería.

Tabla 1. Distribución de la seroprevalencia en hembras caninas por edad en Montería (Córdoba)

Edad/años	n	%	Seropositivos		Seronegativos	
			N	%	N	%
1-4	30	48,38	0	0,0	30	48,39
4-8	25	40,32	3	4,84	22	35,48
>8	7	11,30	1	1,61	6	9,68
Total	62	100,00	4	6,45%	58	93,55%

La seroprevalencia de anticuerpos contra *B. canis* por razas en Montería se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de la seroprevalencia por razas en hembras caninas de Montería (Córdoba)

Raza	n	%	Seropositivos		Seronegativos	
			N	%	N	%
Mestiza	46	74,20	3	4,84	43	69,35
Razas puras	16	25,80	1	1,61	15	24,20
Total	62	100,00	4	6,45%	58	93,55%

La distribución de la seroprevalencia de *B. canis* de acuerdo al historial reproductivo en hembras caninas de Montería se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de la seroprevalencia de acuerdo al historial reproductivo en hembras caninas de Montería (Córdoba)

H. clínica	N	%	Seropositivos		Seronegativos	
			N	%	N	%
Normal	55	88,71	3	4,84	52	83,87
Anormal	7	11,29	1	1,61	6	9,68
Total	62	100,00	4	6,45%	58	93,55%

DISCUSIÓN

Se encontró que la seroprevalencia de anticuerpos contra *B. canis* en hembras caninas en Montería fue del 6,45% (4/62). Mediante la misma técnica en caninos callejeros de Medellín, la seroprevalencia fue menor (2,76%, 1,11%-4,42%), cuando se determinó la seroprevalencia por sexo fue mayor en machos (4,6%) que en hembras y cuando la vivienda era compartida con otros animales domésticos la seroprevalencia fue del 7,5%; concluyéndose que por la presencia de estos anticuerpos, persiste el riesgo zoonótico de transmisión, siendo considerada esta enfermedad como profesional (31).

Mayores valores absolutos han sido reportados por diferentes técnicas de diagnóstico en caninos de Medellín, por ejemplo, con el uso de la 2-MERSAT la seropositividad fue del 17,2% (32), del 6,78% con la técnica del 2ME-PRAP (33) y con una frecuencia del 11% con 2β-mercaptoetanol (25). En Villavicencio, mediante la aglutinación rápida en placa con antígeno mucoide, la seropositividad fue menor (1,49%) y se asoció esta con falsos positivos o reacciones cruzadas (34).

Inicialmente en Medellín, en el 2,55% de las muestras se aislaron bacterias Gram negativas con patrón bioquímico correspondiente que fueron confirmadas como *B. canis* (29, 32); finalmente en la misma ciudad, se documentó un caso humano de por *B. canis* en un criador de caninos, caso en que el aislamiento se hizo de una hembra canina asintomática lactando, con historia previa de la enfermedad, convirtiéndose en una forma de transmisión para los neonatos y en un riesgo zoonótico para veterinarios, propietarios o humanos si no se toman medidas de prevención (35).

Igualmente, anticuerpos contra *B. canis* en caninos han sido reportados por diferentes técnicas de diagnóstico en San Paulo (Brasil) con SAT del 1,77% y del 0,84% por ME-SAT (36), en Turquía del 12,7% con TAT, del 7,73% con 2ME-TAT y 7,45% por ELISA (37), en

Bellavista y Callao distritos de la Provincia Constitucional del Callao (Perú), mediante IDGA la seroprevalencia fue del 15,6±33% (38), en Japón una seroprevalencia del 2,5% en caninos (39). En Buenos Aires con IDGA del 7,3% (40), en Buenos Aires (Argentina) del 14,7% con RSAT y del 10,7% por IELISA (41), en Corea del Sur con 2-ME RSAT la seroprevalencia fue del 14,1 (42) y la infección por *B. canis* se sigue presentando (39). En Corea del Sur del 18,6% en muestras de sangre animales salvajes (perros, gatos y roedores), del 5,7% con C-ELISA y del 9,7% con PCR en tejidos (43) y de un cadáver de ciervo acuático chino se aisló *B. abortus* biovar 1. En Curicó (Chile), mediante la técnica de contrainmunolectroforesis la seroprevalencia fue del 18,18% (44). Todos los anteriores reportes están concluyendo que la infección por *B. canis* se sigue transmitiendo, aun en especies silvestres.

El aislamiento de cepas de *B. canis* en Argentina (37, 38, 45), en Medellín (46) y en Austria (2) sugieren que caninos con serología positiva o aislamientos son indicadores de alto riesgo para la salud pública (zoonosis) en poblaciones expuestas.

La mayor seroprevalencia por edad (4,84%) se presentó en el grupo etáreo de 4 a 8 años, seguido del grupo donde >8 años con el 1,61%, a diferencia del actual estudio en Medellín se encontró que la mayor seroprevalencia (3,7%) se presentó en caninos menores de un año (31). Troncoso et al. en Chile no encontraron diferencias significativas por sexo y edad (44).

La mayor seroprevalencia por razas (4,84%) se presentó en el grupo de hembras mestizas o criollas, seguido del grupo razas puras con el 1,61%. Igualmente en Medellín se encontró que la seroprevalencia en caninos criollos fue del 4,8% (31), pero en Callao no encontraron diferencia estadística significativa entre razas (38).

Con relación a la historia reproductiva de las hembras se determinó que en el 88,7% (55/62) la historia reproductiva fue normal mientras

en el 11,29% (7/62) anormal por el reporte de abortos y reabsorciones embrionarias. Al determinar el historial reproductivo dentro de las hembras seropositivas se estableció que fue normal en el 4,84% (3/62) y en el 1,61% (1/62) fue anormal, aunque estas diferencias no fueron significativas pero (38) en el Perú encontraron diferencia significativa ($p < 0,05$) entre caninos con y sin historia reproductiva (26,5 y 8,6%) (38). En Medellín no encontraron diferencias significativas por sexo pero las poblaciones de caninos callejeros fueron un factor de riesgo para la transmisión de *B. canis* (33). En Nigeria se determinó una seroprevalencia del 5,46% para *B. abortus* y 0,27% para *B. canis*, donde la

mayoría de los caninos seropositivos a *B. abortus* en su alimentación incluían fetos de vacas y abortos (47). En México, un modelo de regresión logística para cepas lisas de *Brucella* spp. asoció la presencia de perros y cabras seropositivas en el mismo rancho (48).

CONCLUSIONES

La seroprevalencia determinada en hembras caninas de Montería permite tener presente esta patología en el diagnóstico rutinario y la presencia de serorreactores es una evidencia y un riesgo epidemiológico para la salud pública.

REFERENCIAS

1. Hollett RB. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology* 2006; 66:575-587.
2. Hofer E, Bag ZN, Revilla FS, Melzer F, Tomaso H, Pez GL, Fasching T, Schmoll F. First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. *New Microbiol* 2012; 35(4):507-510.
3. Center for food security and public health (CFSPH). Brucellosis. Institute for international cooperation in animal biologics; 2009. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucella-canis.pdf> [consultado febrero 20 de 2013].
4. Baek BK, Lim CW, Rahman MS, Kim CH, Oluoch A. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Can J Vet Res* 2003; 67(4):312-314.
5. Hinić V, Brodard I, Petridou E, Filioussis T, Contos V, Frey J, Abril C. Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1. *Vet Microbiol* 2010; 141(3-4):391-392.
6. Ramamoorth S, Woldemeskel M, Ligett A, Snider R, Cobb R, Rajeev S. *Brucella suis* Infection in dogs, Georgia, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(12):2386-2387.
7. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J. Med Microbiol* 2005; 54:457-461.
8. Ardoino SM, Baryta DA, Toso R.E. Brucelosis canina. *Ciencia Veterinaria* 2006; 8(1):49-60.
9. Holst BS, Löfqvist K, Ernholm L, Eld K, Cedersmyg M, Hallgren G. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Vet Scand* 2012; 54:18.
10. Lawaczek E, Toporek J, Cwikla J, Mathison BA. *Brucella canis* in a HIV infected patient. *Zoonoses and Public Health* 2011; 58(2):150-152.
11. López J, Peña A, Pérez R, Abarca K. Tenencia de mascotas en pacientes inmunocomprometidos: actualización y consideraciones veterinarias y médicas. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30(1):52-62.
12. Soloaga R, Salinas A, Poterallo M, Margari A, Suar B, Lucero N, et al. Bacteriemia por *Brucella canis*. Aislamiento con el sistema Bact-Alert. *Rev. Argent Microbiol* 2004; 36:81-84.
13. Ström B, Karin H, Löfqvist, Ernholm L, Karin E, Cedersmyg M, Hallgren G. The first case of *Brucella canis* in Sweden: Background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Vet Scand* 2012; 54:18-27.
14. Lucero NE, Corazza R, Almuzara MN, Reynes E, Escobar GI, Boeri E, Ayala SM. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. 2010; 138(2):280-285.
15. Sayan M, Erdenliğ S, Stack J, Kilic S, Güdücüoğlu H, Aksoy Y, Baklan A, Etiler N. A serological diagnostic survey for *Brucella canis* infection in Turkish patients with Brucellosis like symptoms. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2011; 64:516-519.
16. Ortega CA, Paredes AJ, Guillén OA. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* sp. en donantes del banco de sangre de un hospital de Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2007; 24(4):431-34.
17. Sayan M, Erdenliğ S, Etiler N. Investigation of *Brucella canis* seropositivity by in-house agglutination test antigen in healthy blood donors. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4):655-663.
18. Padilla PF, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL. Diagnosis of Brucellosis. *Open Vet. Sci J* 2010; 4:46-60.
19. AL Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulis, D. Laboratory based diagnosis of Brucellosis. A review of literature. Part I, Techniques for direct detection and identification of *Brucella* sp. *Clin Lab* 2003; 49:487-505.
20. Pinto Da SJ, De Araújo FS, Tatiane Da Paixão TA, Lima SR. Laboratorial diagnosis of animal brucellosis (diagnóstico laboratorial da brucelose). *R. bras. Ci. Vet* 2012; 19(3):117-126.
21. Shin S, Carmichael LE. Canine Brucellosis Caused by *Brucella Canis*. Recent advances in canine infectious diseases. *IVIS*; 1999. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/

- shin/ivis.pdf [consultado febrero 20 de 2013].
22. Ebani W, Cerri D, Fratini F, Andreani E. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiol* 2003; 26(1):65-73.
 23. Corrente M, Franchini D, Decaro N, Greco G, D'Abramo M, Fiorella GM, et al. Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. *New Microbiol* 2010; 33:337-341.
 24. Kauffman LK, Bjork JK, Gallup JM, Boggiatto PM, Bellaire BH, Petersen CA. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. *Zoonoses Public Health* 2014; 61(1):48-54.
 25. Giraldo ECA, Ruiz CZT, Olivera ÁM. *Brucella canis* in Medellín (Colombia), a current problem. *Rev Udca Actual. Divulg Cient* 2009; 12(1):51-57.
 26. Secretaría de Salud y Seguridad Social, Alcaldía de Montería. Informe de vacunación contra rabia urbana; 2012.
 27. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. *Rev. Epidem. Med. Prev.* 2003; 1:8-14.
 28. BioNote, Inc. Anigen Rapid C. *Brucella* Ab Test Kit. Hwaseong, Sputh Korea; 2013.
 29. SAS Statistical Analysis System Institute (SAS). *SAS/STAT User's Guide* (Release 9.1), Cary: NC, USA; 2001.
 30. Congreso Nacional de Colombia. Ley 84; 1989. Por la cual se adopta el estatuto nacional de protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Disponible en: http://www.dib.unal.edu.co/promocion/etica_ley_84_1989.pdf [consultado Noviembre 20 de 2013].
 31. Agudelo FP, Castro B, Rojo OR, Henao VS. Canine brucellosis: Seroprevalence and risk factors in pets from eleven neighbourhoods in Medellín, Colombia. *Rev Salud Pública* 2012; 14(4):644-656.
 32. Jara S, Pérez OD, Di-Lorenzo C, Olivera M. Diagnóstico de brucelosis canina mediante aglutinación en placa en caninos de Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec* 2005; 18(4):381-382.
 33. Ruiz JD, Giraldo ECA, López VL, Chica FJ. *Brucella canis* seroprevalence in stray dogs from Centro de Bienestar Animal La Perla, Medellín (Colombia) 2008. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2010; 23:166-172.
 34. Pardo DA, Pérez AC, Góngora OA, Gómez LL, Moreno VA. Exploratory survey of *Brucella canis* infection in dogs from Villavicencio, Colombia. *Rev. MVZ Córdoba* 2009; 14(2):1690-1696.
 35. Olivera M, Giraldo CA, Di Lorenzo C. PCR identification of *Brucella canis* in canine blood and milk. A case report. *Arch Med Vet* 2011; 43:295-298.
 36. Moraes CCG, Megid J, Souza LC, Crocci AJ. Prevalência da brucelose canina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol* 2002; 69(2):7-10.
 37. Öncel T. Seroprevalence of *Brucella canis* infection of dogs in two provinces in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 2005; 29:779-783.
 38. Ramírez LH, Calle ES, Echevarría CL, Morales CS. Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la provincia constitucional del Callao. *Rev Inv Vet Perú* 2006; 17(1):39-43.
 39. Kimura M, Imaoka K, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. *J. Vet. Med. Sci.* 2008; 70(7):707-709.
 40. Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa ES, Lucero NE. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina* 2008; 68:291-297.
 41. López G, Ayala SM, Efron AM, Gómez CF, Lucero NE. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. *Rev Argent Microbiol* 2009; 41(2):97-101.
 42. Hwa BD, Ju LY. Occurrence of canine brucellosis in Korea and polymorphism of *Brucella canis* isolates by infrequent restriction site-PCR. *Korean J Vet Res* 2009; 49(2):105-111.
 43. Truong LQ, Kim JT, Yoon BI, Her M, Jung SC, Hahn TW. Epidemiological survey for *Brucella* in wildlife and stay dogs, a cat and rodents captured on a farms. *J Vet Med Sci* 2011; 73(12):1597-1601.

44. Troncoso I, Rojas R, Fischer C, Núñez C, Arrué. K Brucelosis en criaderos caninos: seroprevalencia de 33 casos. Hospitales Veterinarios 2013; 5(2):50-55.
45. Di Lorenzo C, Cabral M, Argenio L, Miceli AP. Aislamiento de *Brucella canis* de leche de hembra canina infectada crónicamente. REIE 2010; 5:25.
46. Olivera M, Di Lorenzo C. Aislamiento de *Brucella canis* en un humano conviviente con caninos infectados. Informe de un caso. Colombia Med 2009; 40(2):218-220.
47. Cadmus SI, Adesokan HK, Ajala OO, Odetokun WO, Perrett LL, Stack JA. Seroprevalence of *Brucella abortus* and *B. canis* in household in dogs in southwestern Nigeria: a preliminary report. J. S. Afr Vet Assoc 2011; 82(1)56-57.
48. Mikolon AB, Gardner IA, Hernández DA, Hietala SK. Risk factors for brucellosis seropositivity of goat herds in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. Prev Vet Med 1998; 37(1-4):185-195.