

Brucellosis en criaderos caninos: seroprevalencia de 33 casos.

Canine Brucellosis in dog's breeders: seroprevalence of 33 cases.

Ignacio Troncoso¹ MV; **Rolando Rojas²** MV; **Christof Fischer³** MV DVM; **Camila Núñez⁴** MV; **Karen Arrué⁵** MV.

Recibido: 6 de Junio de 2013

Aprobado: 26 de Junio de 2013

Resumen

La Brucellosis es una enfermedad infectocontagiosa, causada por bacterias del género *Brucella*, específicamente en el canino por *Brucella canis*, la cual causa principalmente fallas reproductivas y abortos en las hembras e infertilidad y epididimitis en los machos.

Desde que se aisló la bacteria en Chile (1978) a partir de hembras que habían abortado, se han realizado pocos estudios sobre la prevalencia de este microorganismo, es por esto que se decidió determinar la seroprevalencia de esta bacteria en tres criaderos de la ciudad de Curicó. Para esto, se analizaron 33 muestras serológicas provenientes de caninos de diversas razas, de ambos性es y de cualquier edad, clínicamente sanos al examen clínico, a los cuales se les tomó una muestra de sangre entera, obteniendo el suero mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, el cual posteriormente fue enviado al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en Santiago, siendo sometido a la técnica de contrainmunoelectroforesis. Este método determina la presencia de anticuerpos frente a *Brucella canis*, siendo el porcentaje de sueros en los que se demuestran anticuerpos entre un 93,3% y un 100%.

De los 33 caninos incluidos en el estudio, 6 (18,18%) resultaron con muestras seropositivas a la prueba y 27 (81,82%) negativas. Este alto valor de prevalencia probablemente se debe a la falta de un programa de control adecuado. Al desglosar los resultados según las variables de sexo ($p: 0,6402$) y edad ($p: 0,3329$), no existió diferencia estadística significativa entre los grupos.

Palabras claves: brucellosis, inmunocromatografía, seroprevalencia.

Abstract

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*. In dogs brucellosis is mainly caused by *Brucella canis*, which causes abortions and reproductive failure in females and infertility and epididymitis in males.

Since the bacterium was isolated in Chile (1978) from bitches that had aborted, there have been few studies on the prevalence of this organism, which is why; we decided to determine the seroprevalence of this bacterium in three dog breeders in the city Curicó. Thirty tr-ee serum samples from different dog breeds where analyzed, all dogs where clinically healthy at clinical examination. A sample of whole blood was taken from each patient and serum was obtained by centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes, which was subsequently sent to the microbiology laboratory of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences at the University of Chile, being subjected to a counterimmunoelctrophoresis test was used to determine the presence of antibodies to *Brucella canis*, being the percentage of sera in which antibodies are demonstrated between 93.3% and 100%.

Of the 33 dogs included in the present study, 6 (18.18%) samples were seropositive to the test and 27 (81.82%) negative, a high prevalence value probably due to the lack of a suitable control program. No statistically significant difference between gender ($p: 0,6402$) and age ($p = 0,3329$) was found.

Keywords: Brucellosis, immunochromatography, seroprevalence.

Introducción

La brucellosis canina es una enfermedad bacteriana zoonótica, de distribución mundial, descrita por primera vez en 1966 en Nueva Jersey, Estados Unidos, a partir de un brote de aborto en perros de raza Beagle.¹ Desde entonces, la bacteria ha sido notificada en EEUU y otros países, incluyendo Rusia, Japón, Nigeria, China y Argentina;² en Chile se reportó el aislamiento de *B. canis* simultáneamente en Valdivia y Santiago.³

El patógeno causante de la enfermedad es *Brucella canis*, un cocobacilo gram negativo, inmóvil e intracelular,⁴ que causa de grandes pérdidas económicas en los criaderos caninos.⁵

Su prevalencia varía de acuerdo al año y la población canina evaluada; por ejemplo en América Latina, podemos observar que en Argentina varía entre un 7,3⁶ y un 43,5%;⁷ en Brasil un 19,9%;⁴ en Perú un 15,6%;⁸ en Colombia entre 6,78%⁹ y un 11%.¹⁰ En nuestro país, destacan los estudios realizados entre 1986 y 1987 en criaderos de perros de la Región Metropolitana, donde se determinó una prevalencia de aproximadamente 13%. Recientemente, un análisis realizado durante 1994 a 2000, sugiere un aumento en la prevalencia regional, debido a los elevados valores (aproximadamente 20%) encontrados.¹¹

Clásicamente, no hay síntomas apreciables en los primeros momentos con excepción de un incremento pasajero de la temperatura, hasta que se produce en hembras un aborto entre los 45 y 55 días de gestación¹ o parto prematuro.¹² Entre los signos no reproductivos en hembras y machos se destacan linfoadenomegalia generalizada, uveítis y discoespondilitis. En los machos, la infección causa epididimitis uni o bilateral, aumento o atrofia testicular, inflamación de próstata y/o de linfonódulos periféricos y esterilidad.⁶

En perros infectados con *B. canis*, el diagnóstico más certero es el aislamiento posterior al cultivo del agente etiológico desde sangre, descargas vaginales, leche, semen, tejidos fetales o placenta.^{10, 13, 14} Una alternativa diagnóstica al aislamiento bacteriológico la constituyen las pruebas serológicas, que determinan la presencia de anticuerpo contra *B. canis*. La efectividad de estas pruebas serológicas, actualmente disponibles en el mercado, es variable debido a que los antígenos de superficie de las especies de Brucellas rugosas, pueden reaccionar en forma cruzada con los anticuerpos producidos contra otras especies de bacterias no patógenas, lo cual puede redundar en variaciones de la sensibilidad y especificidad, llevando al diagnóstico de animales falsos positivos o falsos negativos, dependiendo

del estado de la enfermedad y del antígeno o método serológico empleado.¹⁵

Debido a la ausencia de estudios epidemiológicos en la comuna de Curicó y producto de los escasos datos actualizados de presencia de la enfermedad en criaderos, surge la idea de realizar una investigación para conocer la prevalencia y evaluar su asociación con variables como edad y sexo. Con esto, se pretende argumentar con datos reales, la importancia de establecer medidas preventivas de la enfermedad en criaderos.

Materiales y Método.

Cálculo tamaño muestral

La población total existente en los tres criaderos de la ciudad de Curicó, VII región, Chile, ascendió aproximadamente a los 51 animales. Para el cálculo del tamaño de la muestra, fue necesario utilizar la fórmula de poblaciones finitas.¹⁶

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

N = Total de la población canina (51).

Z_α² = 1.96² (asumiendo una seguridad del 95%).

p = proporción esperada (en este caso 13,5% = 0.135)³

q = 1 - p (en este caso 1 - 0.035= 0.865).

d = precisión (en este caso deseamos un 5% = 0,05).

$$n = 51 * 1.96^2 * 0.135 * 0.865 = 32,86 \text{ animales}$$

$$0.05^2 * (51-1) + 1.96^2 * 0.135 * 0.865$$

En base a la formula descrita anteriormente, se obtuvo un total de 33 caninos, utilizando un muestreo aleatorio estratificado, es decir, se tomaron muestras de 11 individuos por criadero, los cuales fueron seleccionados al azar mediante la utilización de un programa de selección aleatoria, el que permitió seleccionar un número de caninos de la base de datos de cada uno de los criaderos.

Tamaño y toma de muestra.

El presente estudio se realizó en la ciudad de Curicó, ubicada en la VII región, específicamente en tres criaderos caninos de la misma zona; entendiéndose como criadero

¹Jefe de Carrera Medicina Veterinaria Universidad Santo Tomás Sede Concepción. ignaciotroncoso@santotomas.cl

²Docente Epidemiología. Escuela Medicina Veterinaria. Universidad Santo Tomás Sede Concepción.

³Coordinador del Centro de Práctica. Escuela Medicina Veterinaria. Universidad Santo Tomás, Concepción.

⁴Médico Veterinario. Universidad Santo Tomás, Concepción.

⁵Licenciada Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción, Sede Chillán.

a persona natural, que cuente con tres o más ejemplares reproductores, y que son utilizados regularmente para la reproducción.¹⁷ Éstos fueron identificados como Criadero A, B y C para mantener la confidencialidad y evitar perjuicios de orden comercial; así mismo, cada perro fue identificado con un número. Se contó con un total de 33 caninos, de diferentes razas, de ambos性es y diversas edades. La muestra analizada fue de sangre entera, la cual fue depositada en un tubo sin anticoagulante, y centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos, para luego realizarle la técnica de contrainmunoelectroforesis en Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en Santiago de Chile.

Análisis de las muestras:

Como método diagnóstico se utilizó la técnica de contrainmunoelectroforesis, que corresponde a una técnica cualitativa que permite obtener resultados positivos o negativos, determinando la presencia de anticuerpos frente a las proteínas citoplasmáticas de *Brucella canis*, siendo un método altamente sensible y específico frente al diagnóstico de brucelosis canina.¹¹

Distribución por sexo y edad.

Para el análisis de los resultados, se procedió a dividir a los animales en grupos según las siguientes variables:

Sexo: macho y hembra.

Edad: se constituyeron tres grupos etarios; el primero para individuos entre cinco meses y dos años 11 meses, el segundo para individuos entre tres años y seis años 11 meses y el último grupo para edades entre siete años y 10 años 11 meses.

Análisis estadístico

Considerando que fue un estudio descriptivo y transversal, se consideró la frecuencia de presentación como porcentaje. Para determinar si existían diferencias significativas entre individuos de diferente edad, sexo, se aplicó el test de Fisher, con un nivel de significancia del 95% y un margen de error del 5%.

Resultados

Del total de 33 caninos pertenecientes a tres criaderos de la ciudad de Curicó, sometidos a la técnica de contrainmunoelectroforesis (Tabla 1), seis de ellos resultaron seropositivos (Tabla 2), lo cual equivale a una seroprevalencia del 18,18%, mientras que los 27 restantes fueron

Tabla 1: Seroprevalencia de *Brucella canis* en tres criaderos de la Ciudad de Curicó.

Criadero	Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%
A	1	9.09	10	90.91
B	2	18.18	9	81.81
C	3	27.27	8	72.73

Tabla 2: Seropositivos a *Brucella canis*.

POSITIVOS	6 (18,18)
NEGATIVOS	27 (81,82%)
TOTAL	33

negativos (81,82%).

Dentro de los animales incluidos en el estudio, 23 pertenecían al sexo hembra y 10 al sexo macho, lo cual equivale al 69,7% y 30,3% del total respectivamente, siendo el 10% (1 de 10) de los machos y el 21,73% (5 de 23) de las hembras positivas a *Brucella canis*, respectivamente (Tabla 3), no existiendo asociación estadísticamente significativa entre los grupos ($p: 0,6402$).

Tabla 3: Distribución de los pacientes según sexo y resultado del muestreo.

SEXO	DISTRIBUCION	POSITIVOS a B. canis
Machos	10 (30,3)	1 (10%)
Hembras	23 (69,7%)	5 (21,73%)
TOTAL	33	6 (18,18%)

($p: 0,6402$)

Al analizar los datos según los tres grupos etarios, se observó una tendencia a presentar una mayor positividad a *Brucella canis* a caninos entre tres años a seis años 11 meses de edad, encontrándose una prevalencia del 27,27% (3 de 11). Los canes entre cinco meses y dos años 11 meses presentaron una prevalencia del 20% (3 de 15) y no se encontraron animales positivos entre 7 años a 10 años 11 meses (Tabla 4), no siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p: 0,3329$).

Discusión

Se encontraron seis animales seropositivos a *Brucella canis*, demostrándose así que la brucellosis está presente en los tres criaderos analizados, idea que concuerda con lo planteado por algunos autores que mencionan que la mayor prevalencia de esta enfermedad se encontraría en

Tabla 4: Distribución de los pacientes según edad y resultado del muestreo

EDAD	DISTRIBUCION	POSITIVOS a BRUCELLA CANIS
5 meses y 2 años 11 meses	15 (45,5%)	3 (20%)
3 años y 6 años 11 meses	11 (33,3%)	3 (27,27%)
7 años y 10 años 11 meses	7 (21,2%)	0 (0%)
TOTAL		33
(p: 0,3329)		

los criaderos, debido al alto nivel de hacinamiento y la constante reproducción de los animales en estos.^{11,15,18}

A nivel nacional, en criaderos encontramos un estudio realizado por Contreras en 1979, el cual menciona un 11,5% de seropositividad (26 de 226 perros); los individuos analizados pertenecían a 13 criaderos de la Región Metropolitana, los cuales fueron diagnosticados mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar. La alta prevalencia obtenida por Contreras, se puede deber a la poca información sobre la patología existente en nuestro país y el desconocimiento por parte de los propietarios.¹⁹ Situación opuesta fue la obtenida por Vera (2012), que en 60 caninos provenientes de tres criaderos caninos de la comuna de Chiguayante, mediante un kit comercial de inmuno Cromatografía, el cual presenta un 99% de sensibilidad y un 97% de especificidad y determina la presencia de anticuerpos, obtuvo una prevalencia del 0%,²⁰ resultado que no concuerdan con los registrados por Contreras (1979) y por el presente estudio.

Situación similar a nuestros resultados demuestran los estudios realizados por Borie en Valdivia, Chile en el año 2002, realizado a 5 perros adultos, utilizando la técnica contrainmunoelectroforesis para el serodiagnóstico. Este trabajo arrojó un 60% de seropositividad (3 de 5).¹¹ Obrist en 2005, encontró un 11,25% (9 de 80) de prevalencia en la comuna de San Bernardo, región Metropolitana, utilizando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la cual detecta anticuerpos IgG anti *Brucella canis* utilizando una inmunoglobulina marcada para describir el antígeno o el anticuerpo; la especificidad y sensibilidad de esta prueba es incierta, pero puede ser más baja que ELISA, lo que significa que durante la selección puedan pasar falsos negativos.²¹ Fierro en el año 2006, encontró un 12% de seropositividad en perros de la comuna de Huechuraba, región Metropolitana, ocupando contrainmunoelectroforesis²²; mientras que Gómez en el 2007, muestreó a 363 perros en clínicas veterinarias del gran Santiago, encontrando un 16,8% (61 de 363) de seropositividad ocupando

la técnica contrainmunoelectroforesis con antígeno LPS-R de *Brucella ovis*.²³ Es de gran importancia considerar que estas últimas investigaciones no pueden ser comparadas entre sí desde el punto de vista estadístico, ya que fueron realizadas en perros de diferentes situaciones ambientales (semicautiverio y clínicas veterinarias), además de utilizar diferentes técnicas diagnósticas que cuentan con porcentajes de sensibilidad y especificidad distintos.

En lo que respecta a la variable sexo, en criaderos de nuestro país, podemos mencionar a Contreras (1979), que obtiene una prevalencia en la Región Metropolitana en hembras del 11.03% (16 de 145) y en machos del 12.34% (10 de 81), utilizando la técnica inmunodifusión en gel de agar, siendo la diferencia entre estos grupos no estadísticamente significativa ($p: 0,764$).¹⁹ Obrist,(2005), el cual realizó un estudio a caninos en situación de semicautiverio, determinó un 7% (2 de 28) de las hembras positivas y un 13% (7 de 52) de los machos, utilizando la técnica Inmunofluorescencia indirecta.²¹ En el caso del estudio realizado por Gómez en el año 2007, que fue efectuado en Clínicas veterinarias de las 34 comunas del gran Santiago, encontramos un 14.5% (29 de 200) de hembras y un 19,6% (32 de 163) de machos positivos; la técnica utilizada fue contrainmunoelectroforesis. En ambos estudios no existió asociación estadística entre la seropositividad y el sexo ($p: 0,1936$).²³

En la presente investigación se pudo determinar que existe una tendencia a la mayor presentación de la enfermedad en las hembras, a diferencia de los estudios realizados por Contreras (1979), Obrist (2005) y Gómez (2007). Es de importancia destacar el hecho de que en el muestreo realizado en este estudio, el porcentaje de hembras analizadas es superior que el de los machos (69,7% y 30,3% respectivamente), lo cual podría estar explicando la tendencia obtenida.

Los perros pueden infectarse en cualquier etapa de su vida, aunque existe una mayor predisposición en perros jóvenes, ya que en éstos ocurre una mayor actividad reproductiva,⁸

existiendo una mayor prevalencia en caninos que han alcanzado la pubertad, es decir, mayores de seis meses o de un año, lo cual va aumentando con la edad, ya que esta enfermedad se transmite principalmente por vía venérea.²¹ En el caso de las hembras, no existen diferencias en cuanto a susceptibilidad por edades, ya que el aborto ocurre tanto en perras jóvenes (un año) como adultas (10 años), presentándose con mayor frecuencia entre los dos y cuatro años, correspondiendo a la edad óptima de reproducción.⁵

Aunque en la literatura actual existen discrepancias respecto a los grupos etarios más afectados, la gran mayoría de los estudios no encontró diferencia estadística que permita asociar la seropositividad con un rango de edad. Por ejemplo, en Chile en el año 1979, Contreras analizó 226 perros, pertenecientes a 13 criaderos del Área Metropolitana, de los cuales 26 (11,5%) resultaron positivos a la prueba; los reaccionantes positivos se encontraron en mayor número entre las edades de dos a cuatro años. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas atribuibles a grupos etarios ($p > 0,05$).¹⁹ En el año 2005, el estudio realizado por Obrist en perros de semicautiverio de la comuna de San Bernardo, Región Metropolitana de Chile, distribuidos en tres grupos etarios (entre uno y cuatro años, el segundo de cuatro hasta ocho años y el último de mayores a ocho años), evidenció positividad del 4%, 13% y 14% respectivamente, lo cual representa una tendencia, pues al comparar los porcentajes entre los grupos, se ve un aumento de la prevalencia a mayor edad de los animales, sin embargo, la variable edad no tiene relación estadística con la presencia de la enfermedad ($p : 0,4659$).²¹ Fierro, en el 2006 en la comuna de Huechuraba, Región Metropolitana, encontró que existía un número mayor de perros que resultaron positivos entre los 1 a 6 años de edad (3 individuos, lo cual representa un 37.5% de la población), pero sin ser esta diferencia estadísticamente significativa.²²

Por otra parte, en el estudio realizado por Gómez (2007) a 384 caninos pertenecientes a clínicas veterinarias de la capital, según la prueba de independencia de chi cuadrado, se encontró diferencia estadística asociada con la edad ($p: 0,003266$); el grupo que representa el mayor porcentaje de positivos con 28,42% (27 de 95 perros) es el grupo N°3 (tres a cinco años de edad), esto según el autor explicado por el resultado de una enfermedad de carácter crónico con bajas posibilidades de éxito terapéutico²³.

Este agente bacteriano se ha encontrado en seres humanos que han tenido una estrecha relación con perros infectados, así lo demuestra una encuesta que abarcó 137 veterinarios que

trabajaban en clínicas de pequeños animales en la Región Metropolitana, donde seis de ellos (4,3%) presentaron reacción serológica positiva a *Brucella canis*, pudiendo concluir que la brucellosis canina es una zoonosis que presenta riesgo de infección permanente para Médicos Veterinarios y también para personas ajenas a esta actividad,²⁴ lo cual podría ser un factor de riesgo importante para los criadores de estas mascotas.

Conclusiones

Se evidenció la presencia de *Brucella canis* en pacientes caninos de criaderos de la ciudad de Curicó, lo cual queda demostrado por el 18,18% de prevalencia obtenido. Al relacionar el factor sexo y edad con la seropositividad, se determinó que la mayor seropositividad fue en hembras y en individuos entre el rango etario 3 años y 6 años 11 meses, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. A la luz de los resultados, queda de manifiesto la relevancia de realizar una fiscalización exhaustiva a los individuos que ingresan a los criaderos como reproductores, los cuales se deben mantener en cuarentena y ser evaluados hasta que se determine que no presentan ninguna patología que pueda comprometer al resto de los animales del criadero.

Referencias bibliográficas

1. Shin SJ, Carmichael L. Canine Brucellosis caused by *Brucella canis* in Recent Advances in Canine Infectious Diseases. L. Carmichael Ed. IVIS Ithaca NY; 1999. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/shin_es/ivis.pdf
2. Ardoino SM, Baruta DA, Toso RE. Brucellosis canina. Ciencia Veterinaria; 2006, 8(1): 49-60.
3. Borie C, Pinochet L. Brucellosis canina: Conceptos generales y estudios realizados en el país. Monog Med Vet; 1987, 9: 70-78.
4. Guedes IB, Lima AS, Espinheiro RF, Ohashi OM, Manssour MB, Dias HLT. Spatial distribution of canine brucellosis in the city of Belém, pará-brazil. Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress, WSAVA 2009, Sao Paulo, Brazil.
5. Del Águila JP. Detección de anticuerpos contra *Brucella canis* en 5 criaderos caninos del departamento de Guatemala por medio de la prueba de aglutinación rápida en la placa 2-mercaptoetanol (PARP-ME). Proyecto tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Medicina Veterinaria. San Carlos, Guatemala; 2007.
6. Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa-Estani S, Lucero NE. Brucellosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. Revista Medicina (Buenos Aires); 2008, 68:291-297.
7. Wanke M, Baldi P, Loza M, Delpino M, Monachesi N, Comercio E. Canine brucellosis in Argentina: A retrospective study of 731 suspected cases. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction; 2008 Julio 9-11. University of Veterinary Sciences. Vienna, Austria. Consultado el: 10 de Nov de 2011. Disponible en: http://www.ivis.org/proceedings/isccr/2008/oral_com3/1.pdf?LA=1
8. Ramírez H, Calle S, Echevarría C. Prevalencia de brucellosis canina en dos distritos de la provincia constitucional del Callao. Rev Inv Vet Perú; 2006, 17 (1): 39-43.
9. Ruiz J, Giraldo C, López L, Chica J. Seroprevalencia de *Brucella canis* en perros callejeros del Centro de Bienestar Animal "La Perla", Medellín, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias; 2010, 23: 166-172.
10. Giraldo CA, Ruiz-Cortés ZT, Olivera M. *Brucella canis* en Medellín (Colombia), un problema actual. Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica; 2009, 12:210-220.
11. Borie C, Cepeda R, Villarroel M, De los Reyes M. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. Arch Med Vet; 2002, 34 (1):111-116.
12. Galvis E. Prevalencia de la brucellosis canina en la ciudad de Vallegrande. Tesis de Grado. Universidad autónoma "Gabriel René Moreno". Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia; 2003.
13. Sandoval I. Detección de anticuerpos séricos anti *Brucella* spp. en caninos de la ciudad de Chillán. Tesis Méd. Vet. Universidad de Concepción. Chillán, Chile; 2008.
14. Corrente M, Franchini D, Decaro N, Greco G, D'Abramo M, Greco MF, Latronico F, Crovace A, Martella V. Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. New Microbiol; 2010, 33(4), 337-341.
15. Sánchez A. Brucellosis canina y sus implicancias reproductivas. Revista Mevepa; 2007, 20 (1): 29-38.
16. Fernández P. Determinación del tamaño muestral. A Coruña, España; 1996. Consultado 02 dic 2010. Disponible en:<http://www.itescam.edu.mx/principal/syllabus/fpdb/recursos/r53794.PDF>
17. Kennel Club Chile. Reglamento de crianza año 2008. Santiago. Chile; 2008.
18. Bae D, Lee Y. Occurrence of canine brucellosis in Korea and polymorphism of *Brucella canis* isolates by infrequent restriction site-PCR. Korean Journal Veterinary Research; 2009, 49 (2): 105-111.
19. Contreras Silva CR. Investigación serológica de brucellosis en criaderos de perros del área metropolitana. Tesis Méd. Vet. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Pecuarias y Medicina Veterinaria. Santiago, Chile.; 1979.
20. Vera C. Seroprevalencia de *Brucella canis* en 3 criaderos caninos de la Comuna de Chiguayante, Concepción, Chile. Tesis Méd. Vet. Universidad Santo Tomás .Concepción, Chile; 2012.
21. Obrist W. Seroprevalencia de *Brucella canis* en una población canina perteneciente a la comuna de San Bernardo, Región Metropolitana. Tesis Méd. Vet. Universidad Santo Tomás . Santiago, Chile; 2005.
22. Fierro C. Determinación de positividad de brucellosis canina a través del medio contrainmunoelctroforesis en la comuna de Huechuraba. Tesis Méd. Vet. Universidad Mayor. Escuela de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile; 2006.
23. Gómez V. Seroprevalencia de brucellosis canina por B. canis en clínicas Veterinarias del gran Santiago 2002-2003. Tesis Méd. Vet. Universidad de Chile. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Santiago, Chile; 2007
24. Torres DH. Estudio de características demográficas de la población canina en la ciudad de Lanco y nivel de conocimiento de sus propietarios sobre algunas zoonosis. Memoria de titulación. Universidad Austral de Chile. Escuela de Medicina Veterinaria. Valdivia, Chile; 2003.