

Inquérito sorológico e molecular da brucelose canina no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte

Serological and molecular survey of canine brucellosis in the county of Natal, Rio Grande do Norte state

Annielle Regina da Fonseca Fernandes^I Ademilde Gomes Fernandes^{II} Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano^{III} Clebert José Alves^I Pomy de Cássia Peixoto Kim^{IV}
Rinaldo Aparecido Mota^{IV} Sérgio Santos de Azevedo^{I*}

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Brucella* rugosa e anti-*Brucella* lisa em cães do município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, bem como identificar fatores de risco associados à positividade e realizar a detecção molecular em animais soropositivos. Foram utilizados soros sanguíneos de 416 cães atendidos em clínicas veterinárias durante o período de março a novembro de 2011. Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella* rugosa, foi empregada a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), utilizando antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198 e, para o diagnóstico da infecção por *Brucella* lisa, foi utilizado o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT). De animais soropositivos, foram coletadas amostras de sangue com citrato de sódio para o diagnóstico pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). A frequência de anticorpos anti-*Brucella* rugosa foi de 28,9% (120/416). Todos os animais foram negativos para anticorpos anti-*Brucella* lisa. Dentre 80 animais soropositivos, o DNA de *Brucella* spp. foi amplificado em três animais (3,8%). Não foram identificados fatores de risco associados à soropositividade. Conclui-se que a infecção por *Brucella* rugosa está presente no município de Natal, bem como se sugere o monitoramento sorológico de animais atendidos em clínicas visando à identificação de fontes de infecção.

Palavras-chave: brucelose canina, cães, IDGA, PCR, Brasil.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the occurrence of anti-rough *Brucella* and anti-smooth *Brucella* antibodies in dogs from the county of Natal, Rio Grande do Norte state, Brazil, as well as to identify risk factors associated with positivity and to perform

molecular detection of the agent in seropositive animals. Sera from 416 dogs attended in veterinary clinics during the period from March to November 2011 were used. For the serological diagnosis of rough *Brucella* the agar gel immunodiffusion (AGID) test, using antigen of lipopolysaccharides and proteins from *Brucella ovis*, strain Reo 198, was carried, and for smooth *Brucella* the buffered plate agglutination test (BPAT) was used. From seropositive animals, blood samples with sodium citrate were collected for the diagnosis by polymerase chain reaction (PCR). Frequency of anti-rough *Brucella* antibodies was 28.9% (120/416). All animals were negative for anti-smooth *Brucella* antibodies. Of the 80 seropositive animals *Brucella* spp. DNA was amplified in three (3.8%). Risk factors associated with the seropositivity were not identified. It was concluded that rough *Brucella* infection is present in the county of Natal, as well as it is suggested the serological monitoring of animals attended at clinics aiming the identification of sources of infection.

Key words: canine brucellosis, cães, IDGA, PCR, Brazil.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma das principais doenças infectocontagiosas de caráter reprodutivo em cães, causada pela *Brucella canis*, responsável por sérias alterações, culminando geralmente em infertilidade. Nas fêmeas, predominam os abortamentos, natimortos ou nascimento de filhotes fracos, além de orquite e epididimite nos machos, tendo, portanto, uma relevante importância para os criadores de cães de raça (JOHNSON & WALKER, 1992; WANKE, 2004). Devido ao papel que os animais de companhia

^IUnidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Bairro Santa Cecília, 58700-970, Patos, PB, Brasil. E-mail: ssazevedo@cstr.ufcg.edu.br. * Autor para correspondência.

^{II}Clínica Veterinária SOS Animais, Natal, RN, Brasil.

^{III}Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^{IV}Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

representam para a sociedade, em especial os cães, com um convívio cada vez mais estreito e prolongado com seres humanos, deve-se considerar o caráter zoonótico dessa infecção, fato esse comprovado por vários relatos de casos clínicos e estudos de prevalência de anticorpos anti-*B. canis* em humanos (LUCERO et al., 2005; VOSS, 2008).

Somente com o exame clínico não é possível chegar ao diagnóstico da infecção, podendo ser grande o número de animais que permanecem assintomáticos, atuando como importantes fontes de infecção (KEID et al., 2004). Em função da dificuldade e da baixa especificidade do diagnóstico clínico, a confirmação da brucelose canina deve ser realizada por métodos laboratoriais indiretos e diretos, pela detecção de anticorpos séricos, isolamento bacteriano ou métodos moleculares (MINHARRO et al., 2005). O isolamento e a identificação da *B. canis* é um método de alta especificidade diagnóstica, pois demonstra o agente etiológico da doença, mas sua sensibilidade pode ser baixa em decorrência de vários fatores, como eliminação intermitente da bactéria, material mal colhido e mal conservado, além da utilização de antibióticos. Além disso, essa prova requer um período prolongado de tempo até a identificação do agente e laboratórios de biossegurança de nível 3, o que limita sua implementação (LARA et al., 2007). Dessa forma, os testes sorológicos, representados pelas provas de soroaglutinação lenta e rápida, e a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) são os métodos frequentemente utilizados no diagnóstico da doença (PORTO et al., 2008). Os métodos de amplificação de DNA, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), têm demonstrado ser confirmatórios no diagnóstico de brucelose, permitindo encurtar o tempo de diagnóstico, reduzir os riscos de exposição e simplificar os requisitos de infraestrutura necessários (KEID et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

Desse modo, devido à escassez de estudos no Estado do Rio Grande do Norte, particularmente no Município de Natal, e à relevância da doença como zoonose, objetivou-se, com este trabalho, determinar a frequência de anticorpos anti-*Brucella* rugosa e anti-*Brucella* lisa em cães do referido município, bem como identificar os fatores de risco associados à soropositividade e realizar detecção molecular em animais soropositivos.

MATERIAL E MÉTODOS

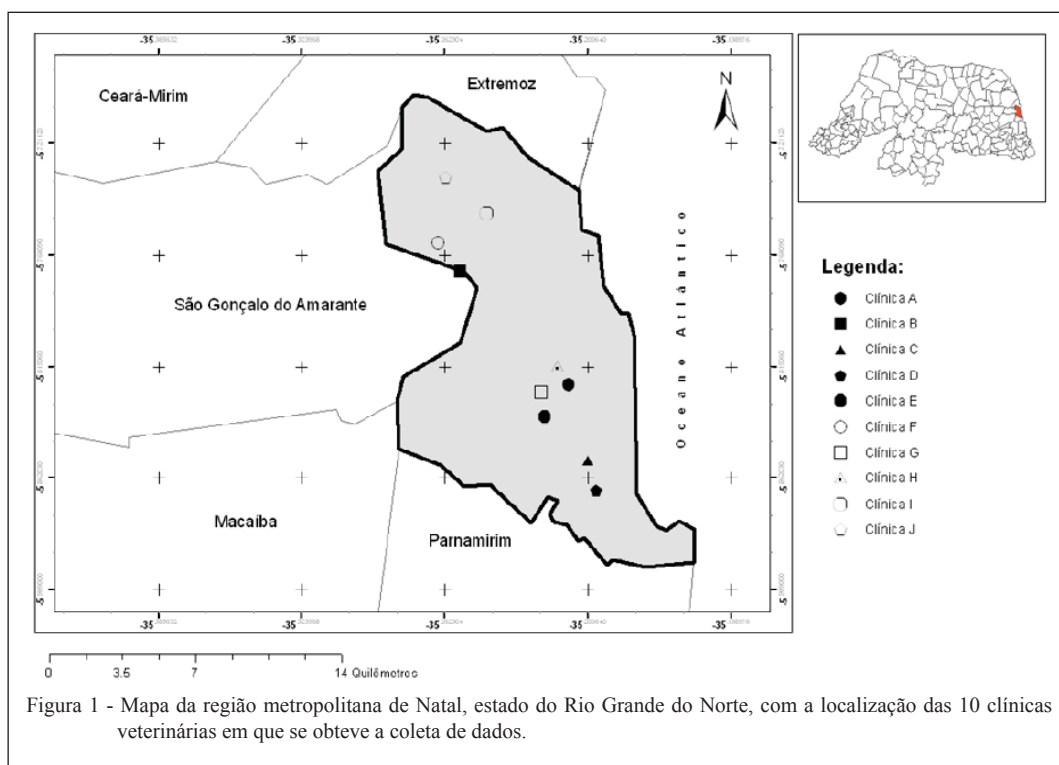
A pesquisa foi realizada no município de Natal, capital do Estado do Rio Grande do Norte.

Foram utilizados 416 cães com idade acima de três meses que passaram pelo atendimento de 10 clínicas particulares, localizadas em vários pontos da cidade (Figura 1), durante o período de março a novembro de 2011. Não foram utilizados critérios probabilísticos para a seleção das clínicas e dos animais, sendo baseada na concordância dos proprietários.

As coletas de sangue foram efetuadas por punção nas veias cefálica ou jugular externa, utilizando-se seringas descartáveis de 5mL, com posterior obtenção do soro e estocagem a -20°C. Na ocasião da coleta de sangue, os proprietários dos cães responderam a um questionário epidemiológico, elaborado de modo a fornecer dados de variáveis (Tabela 2) a serem utilizadas na análise de fatores de risco para a brucelose canina.

Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella* rugosa, empregou-se a técnica de imunodifusão em gel de agar (IDGA), utilizando-se kits produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). A técnica foi executada de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *B. ovis*, amostra Reo 198. Para a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* lisa, o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi utilizado (BRASIL, 2001).

Quatro meses após a coleta de sangue para sorologia, os animais considerados positivos foram novamente localizados para coleta de sangue com anticoagulante (citrato de sódio) e realização do diagnóstico pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). As amostras tiveram seu DNA extraído através da utilização do kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen - USA). O DNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação. Para a reação, foram utilizados os *primers* ITS66 (ACATAGATCGCAGGCCAGTCA) e ITS279 (AGATACCGACGCAAACGCTAC) (KEID et al., 2007), os quais amplificam uma sequência de 214pb e são específicos para bactérias do gênero *Brucella*. A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 200µL, com volume final de 12,5µL, em que foi utilizado 0.5µM de cada *primer* e uma solução pré-misturada, contendo 200µM dNTP, 1,5mM MgCl₂, 5U *Taq* DNA polymerase (*Taq* PCR Master Mix - QIAGEN/USA) e 2,5µL de DNA (DNA genômico na concentração média de 200ng µl⁻¹). Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura, enquanto que a amostra 63/290 de *B. ovis* foi empregada como controle positivo. No ciclo empregado, inicialmente, as amostras foram submetidas a uma desnaturação de 95°C por 2 minutos



e, a seguir, empregados 40 ciclos de amplificação, divididos em quatro fases: Desnaturação: 95°C /30 segundos; Anelamento: 62°C/30 segundos; Extensão: 72°C /30 segundos; e Extensão final: 72°C/5 minutos. A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, com tampão de corrida TBE 0,5X(0,045M TRIS-Borato e 1mM de EDTA, pH 8,0) e o gel submetido à voltagem constante de 6-7V/cm. O padrão de peso molecular empregado foi de 100pb (Fermentas). As amostras para o gel foram coradas com *Blue Green* (LGC Biotecnologia, Brasil) e, posteriormente, fotografado sob luz ultravioleta pelo sistema de foto-documentação (Câmera Kodak Digital DC/120 Zoom).

A análise de possíveis fatores de risco associados à soropositividade foi efetuada em duas etapas: análise univariável e análise multivariável. Na análise univariável, foram formados dois grupos de animais – soropositivos e soronegativos –, que foram comparados frente às variáveis analisadas. Aquelas variáveis que apresentaram valor de $P \leq 0,2$ pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram selecionadas para a análise multivariável, utilizando-se o método de seleção *stepwise forward* de regressão logística múltipla. O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0 for Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 416 animais analisados pela prova da IDGA, 120 foram soropositivos, correspondendo a uma frequência de 28,9%. Em todas as clínicas, houve pelo menos um animal positivo, com frequência de soropositividade variando de 8,8% a 42,3% (Tabela 1). Esse percentual de positividade foi inferior aos resultados obtidos por VARGAS et al. (1996) em Santa Maria, RS, NÁREZ et al. (1999) na cidade do México, MEGID et al. (1999) em Botucatu, SP, MOLNÁR et al. (2001) em Belém, PA, e JIANG et al. (2012) em Pequim, na China, que obtiveram 72,7%, 45%, 57,1%, 45,4%, e 48,8% de positividade, respectivamente. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de esses estudos, com exceção dos dois últimos, terem sido realizados em canis comerciais, que possuíam um histórico de infertilidade, abortamentos e casos de natimortos, sendo um ambiente altamente favorável para a difusão da infecção, devido às condições de confinamento dos animais, favorecendo a transmissão da bactéria, pelo fato de haver um contato íntimo de animais doentes e sadios. No presente trabalho, foram examinadas amostras de animais que não apresentavam histórico de problemas reprodutivos que poderiam ser sugestivos de brucelose canina.

Todos os animais foram negativos para anticorpos anti-*Brucella* lisa. Isso pode ser

Tabela 1 - Frequência de anticorpos anti-*Brucella* rugosa de acordo com a clínica veterinária e sua localização em 416 cães do município de Natal, Rio Grande do Norte, no período de março a novembro de 2011.

Clínicas veterinárias	Nº de animais utilizados	Nº de animais positivos (%)	Localização
A	123	52 (42,3)	Zona sul
B	52	13 (25,0)	Zona sul
C	49	18 (36,7)	Zona sul
D	35	6 (17,1)	Zona oeste
E	11	1 (9,1)	Zona oeste
F	6	1 (16,7)	Zona leste
G	84	21 (25,0)	Zona norte
H	34	3 (8,8)	Zona norte
I	10	1 (10,0)	Zona norte
J	12	4 (33,3)	Zona norte
Total	416	120 (28,9)	-

justificado pelo fato de ter sido utilizada população de cães urbanos, uma vez que a infecção natural de cães por brucelas lisas, especialmente *B. abortus*, é de ocorrência esporádica e resulta do contato estreito de cães, geralmente de zona rural, com bovinos infectados. Os cães infectam-se por ingestão de produtos de origem animal *in natura*, contato ou ingestão de tecidos animais, restos placentários ou de fetos abortados contaminados (CARMICHAEL & GREENE, 1998; AZEVEDO et al., 2003). Essa espécie parece ser mais resistente à infecção por brucelas lisas, sendo raras as manifestações clínicas decorrentes da infecção (AZEVEDO et al., 2003).

Dos 120 animais soropositivos, 80 foram localizados, dos quais foi feita coleta de sangue para detecção molecular do agente. Nenhum animal apresentou sintomatologia sugestiva de brucelose canina. A frequência de amplificação de DNA pela PCR nesses animais foi de 3,8% (3/80). Essa discrepância entre animais soropositivos e detecção molecular do agente pode ser explicada pelo fato de a bacteremia, na brucelose canina, apesar de prolongada, passa a ser intermitente e eventualmente diminuir em infecções crônicas (JOHNSON & WALKER, 1992). Além disso, na prova sorológica empregada, foram utilizados antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa. Testes baseados em antígenos de superfície são mais utilizados como provas de triagem e apresentam alta sensibilidade

no diagnóstico da brucelose canina. No entanto, esses antígenos também são compartilhados com outras bactérias, como *Moraxella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* sp. e *Bordetella bronchiseptica*, resultando na ocorrência de reações cruzadas (JOHNSON & WALKER, 1992; CARMICHAEL & GREENE, 1998).

De acordo com CARMICHAEL & GREENE (1998) e MEGID et al. (1999), em geral, enquanto há persistência da bacteremia, os títulos de anticorpos anti-LPS permanecem elevados. Com o passar do tempo, a tendência é de que ocorra redução nos títulos de anticorpos séricos, de modo que os animais permanecem com títulos baixos ou até mesmo sorologicamente negativos. No entanto, pode haver ainda uma flutuação nos títulos de anticorpos, tanto na presença quanto na ausência de bacteremia. Apesar de delineamentos diferentes do presente estudo, SALGADO et al. (2008) e KEID et al. (2009) também corroboraram o fato de que os testes sorológicos devem ser cuidadosamente utilizados como testes de triagem e que a associação entre métodos diretos e indiretos norteia a melhoria na sensibilidade relativa do teste sorológico, quando comparado com o seu uso individual, sugerindo que essa relação deve ser aplicada no diagnóstico da doença.

Na análise univariável para os fatores de risco, as variáveis selecionadas foram tipo de criação, contato com outros animais e passear com os cães

Tabela 2 - Análise univariada para fatores de risco associados com a soropositividade para *Brucella rugosa* em 416 cães do município de Natal, Rio Grande do Norte, no período de março a novembro de 2011.

Variável	Categoria	Nº total de animais	Nº de animais soropositivos (%)	P
Escolaridade do proprietário	1ª Grau incompleto	2	0 (0)	0,545
	1ª Grau completo	3	2 (66,7)	
	2ª Grau incompleto	13	3 (23,1)	
	2ª Grau completo	181	48 (26,5)	
	3ª Grau incompleto	23	7 (30,4)	
	3ª Grau completo	194	60 (30,9)	
Sexo dos animais	Macho	192	49 (25,5)	0,201
	Fêmea	224	71 (31,7)	
Idade dos animais	3 – 12 meses	48	17 (35,4)	0,721
	13 – 48 meses	147	41 (27,9)	
	49 – 72 meses	63	19 (30,2)	
	> 72 meses	158	43 (27,2)	
Raça	Sem raça definida	101	30 (29,7)	0,927
	Com raça definida	315	90 (28,6)	
Tipo de criação	Domiciliar	372	113 (30,4)	0,134*
	Semi-domiciliar	38	6 (15,8)	
	Solto	6	1 (16,7)	
Alimentação	Ração comercial	261	77 (29,5)	0,548
	Comida caseira	13	2 (15,4)	
	Ração+comida caseira	142	41 (28,9)	
Contato com outros animais	Não	186	46 (24,7)	0,119*
	Sim	230	74 (32,2)	
Contato com animais silvestres	Não	392	112 (28,6)	0,789
	Sim	24	8 (33,3)	
Ambiente dos cães	Terra	14	6 (42,9)	0,302
	Cimento	231	61 (26,4)	
	Terra+Cimento	171	53 (31,0)	
Limpeza do ambiente dos cães	Não	5	1 (20,0)	1,000
	Sim	411	119 (29,0)	
Vacinação	Não	31	6 (19,4)	0,314
	Sim	385	114 (29,6)	
Passear com os cães	Não	206	51 (24,8)	0,086*
	Sim	210	69 (32,9)	
Viajar com os cães	Não	345	97 (28,1)	0,561
	Sim	71	23 (32,4)	

* Variáveis selecionadas para a regressão logística múltipla ($P \leq 0,2$).

(Tabela 2). No entanto, não foram identificados fatores de risco na análise multivariável. Embora não tenham sido identificados fatores de risco para a infecção por *Brucella* rugosa, algumas variáveis merecem ser destacadas como a idade e a raça dos animais.

Considerando a idade dos animais, verificou-se que 85,8% (103/120) dos animais positivos tinham mais de um ano de idade. Resultado similar foi observado por AZEVEDO et al. (2003) e FERNANDES et al. (2011), que encontraram maior proporção de resultados positivos em animais com idade superior a um ano. Isso pode ser justificado pela maturidade sexual e consequente cobertura, bem como pela maior possibilidade de contato com animais infectados em função da idade (JOHNSON & WALKER, 1992; CARMICHAEL & GREENE, 1998). Além disso, ainda de acordo com JOHNSON & WALKER (1992), animais impúberes podem adquirir a infecção, pois, normalmente, a manifestação clínica é apenas uma linfadenopatia uni ou bilateral, enquanto que os sinais clínicos reprodutivos só se manifestam após a puberdade.

Analisando a raça, também não foi constatada associação com a ocorrência de soropositivos. No entanto, foi observado que 75% (90/120) dos animais positivos eram de raça definida. Quando das primeiras descrições de cães infectados por *B. canis*, os animais da raça Beagle foram considerados como os mais susceptíveis (MOORE, 1969). No entanto, posteriormente, a doença passou a ser diagnosticada em cães de raças diversas (CARMICHAEL & KENNEY; 1968; FREDRICKSON & BARTON, 1974). Vale salientar que grande parte dos animais do presente estudo eram de raça definida, e isso se deve à própria preferência de seus proprietários, que acabam por adquiri-los através de criações domiciliares informais. A prevenção da infecção é particularmente importante nesses lugares, pois, uma vez introduzida numa população confinada, a doença se dissemina rapidamente (KEID et al., 2004).

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que a infecção por *Brucella* rugosa, detectada por sorologia e PCR, está presente em cães atendidos em clínicas veterinárias do município de Natal. Embora não tenham sido identificados fatores de risco, sugere-se o monitoramento sorológico de animais atendidos, visando à identificação de fontes de infecção.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O referido trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, sob o número 0018/240712.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, S.S. et al. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p.156-160, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-36X2003000400003>. Acesso em: 02 out. 2012. doi: 10.1590/S0100-736X2003000400003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Inquérito soropidemiológico da brucelose - **Manual de procedimentos**. Brasília, 2001. 20p.
- CARMICHAEL, L.E.; GREENE, C.E. Canine brucellosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1998. p.248-257.
- CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine abortion caused by *Brucella canis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.152, p.605-616, 1968.
- FERNANDES, A.R.F. et al. *Brucella canis* infection in dogs attended in veterinary clinics from Patos, Paraíba state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1405-1408, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822011000400023&script=sci_arttext>. Acesso em: 23 set. 2012. doi: 10.1590/S1517-83822011000400023.
- FREDRICKSON, L.E.; BARTON, C.E. A serologic survey for canine brucellosis in a metropolitan area. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.11, p.987-989, 1974.
- JIANG, H. et al. Reemergence and genetic comparison of *Brucella canis* in China, using a multiple-locus variable-number tandem-repeat assay. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.419-421, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351100410X>>. Acesso em: 20 set. 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.014.
- JOHNSON, C.A.; WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian: Small Animal**, v.14, p.763-772, 1992.
- KEID, L.B. et al. *Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.1-2, p.161-166, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822004000100027>. Acesso em: 12 out. 2012. doi: 10.1590/S1517-83822004000100027.
- KEID, L.B. et al. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.22-26, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528808001161>>. Acesso em: 23 set. 2012. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.05.012.

- KEID, L.B. et al. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.951-965, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11259-006-0109-6?LI=true>>. Acesso em: 23 set. 2012. doi: 10.1007/s11259-006-0109-6.
- LARA, V.H.H. et al. Laboratorios de bioseguridad nivel 3 y 4: investigación de patógenos peligrosos. **Revista Mexicana de Patología Clínica**, v.54, p.177-186, 2007.
- LUCERO, N.E. et al. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.457-461, 2005.
- MEGID, J. et al. Epidemiological assessment of canine brucellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.439-440, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000500007>. Acesso em: 10 set. 2012. doi: 10.1590/S0102-09351999000500007.
- MINHARRO, S. et al. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, p.167-173, 2005.
- MOLNÁR, L. et al. Capacidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico de brucelose canina. **A Hora Veterinária**, v.21, p.45-49, 2001.
- MOORE, J.A. *Brucella canis* infection in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.2034-2037, 1969.
- NÁREZ, G.M. et al. Seguimiento de un brote de *Brucella canis* en un criadero de perros en la ciudad de Mexico. **Técnica Pecuaria en México**, v.37, p.43-50, 1999.
- OLIVEIRA, M. et al. Identificación por PCR de *Brucella canis* en sangre y leche canina. Reporte de un caso. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.43, p.295-298, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2011000300012&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 ago. 2012. doi: 10.4067/S0301-732X2011000300012.
- PORTO, W.J.N. et al. Associação entre distúrbios reprodutivos e anticorpos anti-*Brucella* sp em cães atendidos em clínicas particulares da cidade de Maceió-AL. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.15, p.6-9, 2008.
- SALGADO, V.R. et al. Evaluation of rapid slide agglutination test with and without 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT and RSAT) and comparison with microbiological culture and Polimerase Chain Reaction (PCR) for the diagnosis of canine brucellosis. **Biológico**, v.70, p.107-216, 2008.
- VARGAS, A.C. et al. Brucelose canina: relato de caso. **Ciência Rural**, v.26, p.305-308, 1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781996000200024&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 ago. 2012. doi: 10.1590/S0103-84781996000200024.
- VOSS, C.R. **Soroprevalência da brucelose canina para *B. canis* e *B. abortus* e avaliação sorológica dos humanos contactantes da cidade de Marília-SP**. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, SP.
- WANKE, M.M. Canine brucellosis. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.195-207, 2004.