



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE
UNA PRUEBA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CANINA

VERONICA ARÁNGUIZ GAETE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO, CHILE

2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE
UNA PRUEBA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CANINA

VERONICA ARÁNGUIZ GAETE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL MERINO
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: SONIA ANTICEVIC CÁCERES

SANTIAGO, CHILE
2011

MEMORIA DE TÍTULO

“DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE UNA PRUEBA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CANINA”

“ANALYTICAL DETERMINATION OF POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) SENSITIVITY FOR THE DIAGNOSIS OF CANINE BRUCELLOSIS”

VERONICA ARÁNGUIZ GAETE*

*Departamento Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento: Proyecto FIV 121014019102003

RESUMEN

La Brucelosis canina es una enfermedad infectocontagiosa zoonótica causada por la bacteria *Brucella canis*, afectando principalmente el sistema reproductivo de los perros en ambos sexos. Los signos de esta enfermedad no son evidentes clínicamente e incluso muchos pueden ser asintomáticos. Se caracteriza por producir aborto tardío en hembras y orquitis, epididimitis e infertilidad en machos, pero muchas veces estos signos pueden pasar desapercibidos. En este estudio se determina la sensibilidad analítica de un ensayo PCR tanto para muestras de sangre contaminadas como en cultivos puros para el diagnóstico de brucelosis canina, comparando dos métodos de extracción de DNA. Como resultado se obtuvo que la prueba PCR es capaz de detectar la bacteria en sangre pero obteniendo resultados positivos sólo con uno de los métodos de extracción, detectándose DNA hasta el nivel de los femtogramos.

Palabras claves: *Brucella canis*, brucelosis, perros, PCR

ABSTRACT

Canine brucellosis is a infectious zoonotic disease caused for the bacteria *Brucella canis*, mainly affecting the reproductive system of animals. The signs of this disease are not evident clinically and even may be asymptomatic. Is characterized by producing late-term abortion in females and orchitis, epididymitis and infertility in males. In this study, it was determined the analytical sensitivity of a PCR assay both on contaminated blood samples and pure cultures for the diagnosis of canine brucellosis, comparing two DNA extraction kits. The result are showing that the PCR test is capable of detecting bacteria in blood, although just with only one kit. In pure cultures, PCR detection was made at the level of femtograms.

Key words: *Brucella canis*, brucellosis, dogs, PCR

INTRODUCCIÓN

Brucella canis es una bacteria rugosa o mucoide, Gram-negativa e intracelular facultativa, que tiene a los cánidos como principal reservorio (8). Fue aislada por primera vez por Leland Carmichael en 1966, y se diferencia de las otras especies del género *Brucella* (excepto *B. ovis*) en que forma colonias rugosas. Los perros pueden ser infectados por cuatro de las seis especies de *Brucella* (*B. canis*, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, excluyendo *B. ovis* y *B. neotomae*) (8). A pesar de la descripción de casos de brucelosis en perros causada por *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*, éstas producen sólo infección ocasional, siendo de importancia epidemiológica sólo *B. canis*, causante de la brucelosis canina (15).

La brucelosis en perros, es una enfermedad caracterizada por abortos en hembras y epididimitis, atrofia testicular e infertilidad en machos. Es una enfermedad insidiosa y muchos perros no tienen signos prominentes (4). Los signos clínicos van desde asintomático, linfadenopatía, orquitis y epididimitis, muerte embrionaria, abortos y atrofia testicular (8). Afecta a todas las razas de perros y puede ocasionalmente afectar al ser humano. En el medio ambiente, perros callejeros y salvajes siguen siendo reservorios predominantes (8).

Un estudio realizado por Gómez (2007) sobre seroprevalencia de brucelosis canina en clínicas veterinarias de la Región Metropolitana, arrojó un porcentaje de un 16,8% lo que indica que es una enfermedad de importancia en la población canina.

Las rutas de entrada de este patógeno son la mucosa oronasal, genital y conjuntival. También se ha observado que la convivencia con machos infectados puede resultar en infección (15). Una vía predominante es la transmisión sexual, donde la probabilidad de propagación sigue siendo alta, debido al gran número de organismos liberados en secreciones reproductivas (8).

Perros asintomáticos portan organismos de *B. canis* por intervalos prolongados (8). La bacteria se localiza en nódulos linfáticos, bazo, médula ósea y tracto reproductivo (4). Una característica común e importante para el diagnóstico de la enfermedad es el largo período de sostenida bacteremia donde más de 10^3 bacterias/mL de sangre son comúnmente encontradas después de un mes post infección. La bacteremia puede ser tan corta como hasta seis meses, pero comúnmente persiste por más de uno o dos años y se ha observado por hasta cinco años (4). A continuación los organismos se localizan en los tejidos

genitales y desde ahí se liberan en forma continua o recurrente, lo que puede durar de meses a años (8).

En los machos, la próstata y epidídimo sirven como sitio efectivo para la transmisión bacteriana. Estos dos tejidos son un sitio focal para la diseminación si el macho sigue siendo activo reproductivamente. Inicialmente las muestras de semen tienen una mayor concentración de la bacteria durante los primeros dos meses post infección, seguida de una excreción esporádica y a menor escala durante varios años, en que el hospedero no muestra enfermedad aparente (8).

El síntoma clásico de brucelosis canina en hembras es el aborto tardío, entre 30 y 57 días de gestación, con una mayor frecuencia observada entre los días 45 y 55. Los cachorros abortados usualmente aparecen parcialmente autolisados y muestran las lesiones características de una infección bacteriana generalizada: edema subcutáneo, congestión y hemorragia subcutánea de la región abdominal, pérdida de fluido peritoneal serosanguinolento, con infiltración focal de células linfoides y lesiones degenerativas en hígado, bazo, riñones e intestino. La perra continúa eliminando una descarga pardusca o verde- gris durante un largo período (15).

En machos durante la fase aguda, el epidídimo aumenta de tamaño, acompañado de dolor y de la presencia de fluido serosanguinolento. En la fase crónica, el epidídimo disminuye de tamaño, su consistencia es más dura y los testículos se atrofian (15).

Se han desarrollado métodos directos e indirectos de diagnóstico, entre los que se encuentran:

- Aislamiento bacteriano: es el único método directo que proporciona un diagnóstico definitivo de brucelosis en perros. Sin embargo, esto no siempre es posible y un diagnóstico inequívoco no se ha alcanzado en algunos casos (15). Además es de lento desarrollo, apareciendo las primeras colonias a los 2 a 3 días de incubación a 37 °C (2).

- Métodos indirectos: son las técnicas realizadas actualmente, y se basan en la detección de anticuerpos. Uno de los principales problemas que enfrenta este tipo de diagnóstico es que no pueden detectar títulos de anticuerpos antes de la tercera semana post infección y que los anticuerpos disminuyen fuertemente en los períodos abacterémicos por falta de estimulación antigénica (2). Además, se pueden obtener falsos positivos, ya que

IgM tiene reacciones cruzadas con otras bacterias tales como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas* al utilizar antígenos desde *B.ovis* y *B.canis* (15).

Las pruebas convencionales detectan anticuerpos contra componentes de la pared celular (2). Existen pruebas de aglutinación rápida en placa (SAT) y lenta en tubo (TAT), de inmunodifusión en gel de agar (AGID) (4,8,14,15), contra inmuno electroforesis (CIEF) (2,7,14), Inmunofluorescencia indirecta (IFA) (4,,14,15) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (2,8,14,15).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene el potencial para satisfacer la necesidad de mejores herramientas de diagnóstico, es un proceso rápido, simple y requiere poca mano de obra. Siempre y cuando se dé una atención cuidadosa para evitar contaminación, el método es muy seguro y por lo general altamente reproducible en un laboratorio debidamente equipado (3). Esta prueba es una alternativa a los métodos bacteriológicos para el diagnóstico de brucelosis, ya que detecta directamente el DNA bacteriano y no depende de la viabilidad bacteriana, además de ser sensible y específico (9,10,11,12).

La detección de DNA de *Brucella* spp., en sangre por PCR ya ha sido reportada en perros, bovinos, caprinos, búfalos y en los seres humanos (10). En perros, además se ha utilizado en muestras de suero (12), sangre (9), torulados vaginales (11) y en semen (9), obteniéndose resultados favorables. Otro estudio realizado por Aras y Uçan (2010), aplicando la técnica de PCR a muestras de linfonodos inguinales para la detección de *B. canis*, también reportó una alta sensibilidad y especificidad, lo que sugiere que es una técnica de buen rendimiento para el diagnóstico de la enfermedad.

Este estudio tiene como objetivo determinar la sensibilidad analítica de dos kits diagnósticos de extracción de DNA, de una prueba de PCR para el diagnóstico de *B.canis* tanto, en muestras de sangre contaminadas como en cultivos puros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), considerando las normas de bioseguridad para el manejo de bacterias zoonóticas, tales como: utilización de guantes, uso de delantal exclusivo para el laboratorio, uso de campana de bioseguridad, separación del material utilizado y su posterior esterilización en autoclave.

1. La bacteria

Se utilizó una cepa de *B. canis* aislada en el Laboratorio de Microbiología FAVET, desde una muestra de orina de un animal positivo serológicamente a brucelosis canina. El animal presentaba signos tales como discoespondilitis, atrofia testicular, endocarditis, entre otros. La cepa se encontraba almacenada a -80 C° mediante sistema Microbank®.

2. Muestras de sangre:

La sangre fue obtenida a partir de dos animales negativos a brucelosis canina por prueba de PCR, extrayendo de cada uno 3 mL desde la vena cefálica (6 mL totales) y recolectada en tubo citrato de sodio al 4,5 %. De esta sangre, se utilizaron 450 µL distribuida en 6 tubos de 1,5 mL, obteniendo 6 muestras totales.

3. Extracción de DNA

En el estudio se utilizaron los kits: High pure PCR template kit (Roche®) y Genome DNA purification kit #0512 (Fermentas®), según las indicaciones de los laboratorios productores.

4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):

Para este ensayo se utilizaron los partidores de *Brucella* spp. 26 A1 y 26 B indicados en la **Tabla 1**.

Este trabajo se realizó en triplicado tanto para las muestras de sangre contaminadas como para los cultivos puros, y el sitio blanco a amplificar fue el gen *bp26* que codifica una proteína inmunodominante en infecciones causadas por *Brucella* spp. en bovinos, ovinos y humanos (5). Esta proteína se encuentra en el espacio periplásmico y es altamente conservada dentro del género *Brucella* (6)

Tabla 1: Partidores utilizados y tamaño del producto esperado

Partidor	Blanco	Secuencia (5'→3')	Tamaño del producto pb
26 A1	<i>bp26 D</i>	gccgtgtggtgaaatcagtg	386
26 B	<i>bp26 R</i>	gagcgtgacattgccgata	

Las muestras de sangre como las obtenidas a partir de cultivos puros, fueron tratadas de la siguiente forma:

4.1 La reacción de amplificación del DNA fue efectuada en un volumen final de 12,5 µL, utilizando: buffer PCR (Invitrogen®), 1,6 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de los partidores y 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Invitrogen®). La reacción se llevó a cabo en un Termociclador (ATC 201ver.509), considerando una denaturación inicial de 5 min a una temperatura de 94°C, y posteriormente 33 ciclos consistentes en denaturación a 94°C por 40 s, hibridación a 55°C por 40s, extensión a 72°C por 1 min y finalmente una extensión final a 72°C durante 7 min.

4.2 Para la electroforesis se utilizó agarosa al 1%, marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen®), buffer de carga 10X (Invitrogen®) y Buffer TE (Winkler®)1X. Este proceso se llevo a cabo durante 1 hora a 100 Volt. Finalmente el DNA fue visualizado por tinción con bromuro de etidio y observación en transiluminador UV, esperando como resultado positivo la visualización de bandas de 386 pb.

4. Análisis de sensibilidad analítica en sangre:

Se realizó un cultivo de *B. canis* en 3 mL de caldo tripticasa-soya (BD®), incubándolo por 72 h a 37°C. Pasado este tiempo, se traspasó 1,5 mL de este cultivo a un tubo de 1,5 mL, centrifugando a 13.000 x g durante 15 min. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se lavó con agua destilada, resuspendiendo y centrifugando nuevamente. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente se utilizó 1 mL de la suspensión bacteriana, la que fue traspasada a un nuevo tubo de 1,5 mL. Se realizaron diluciones de esta suspensión en NaCl al 0,9%, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁶.

Se prepararon seis tubos 1,5 mL cada uno con 450 μ L de sangre, y se añadieron 50 μ L de las diluciones obtenidas anteriormente a cada tubo, mezclando homogéneamente. Finalmente se realizó extracción de DNA de cada tubo utilizando los kit Roche[®] y Fermentas[®].

Para el recuento de UFC de las diluciones bacterianas, se inocularon 100 μ L en placas agar *Brucella* (Difco[®]) y se incubaron a 37°C durante 48 h.

5. Análisis de sensibilidad analítica desde cultivos puros:

Se realizó un cultivo de *B. canis* en 3 mL de caldo tripticasa-soya (BD[®]), incubándolo por 72 h a 37°C. Pasado este tiempo, se traspasó 1,5 mL de este cultivo a un tubo centrifugando a 13.000 x g durante 15 min. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se lavó con agua destilada, resuspendiendo y centrifugando nuevamente. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente se utilizó 1 mL de la muestra, la que fue traspasada a un nuevo tubo de 1,5 mL.

Posteriormente se extrajo el DNA utilizando los kit Roche[®] y Fermentas[®] y se cuantificó mediante espectrofotómetro a 260 nm. A continuación, se realizaron diluciones 1:10, 1:1000 y 1:1000000 en agua destilada libre de nucleasas (Merck[®]), de la muestra de DNA obtenida por cada método. Finalmente se realizó la prueba PCR tanto para la muestra sin diluir como para las diluciones restantes, con ambos kits, comparando así sus resultados.

RESULTADOS

1. Análisis de sensibilidad analítica en muestras de sangre:

Mediante transiluminador U.V se lograron observar bandas alrededor de los 385 pb con el kit Roche® a partir de dilución -1 a la -4, como se puede apreciar en la Figura 1. El kit Fermentas® no detectó positividad en ninguna de las diluciones realizadas. En la Tabla 2 se pueden ver los resultados de ambos kit y el recuento de UFC correspondiente.

Figura 1. Análisis de sensibilidad analítica de la prueba PCR en muestras sangre contaminada, Kit Roche®

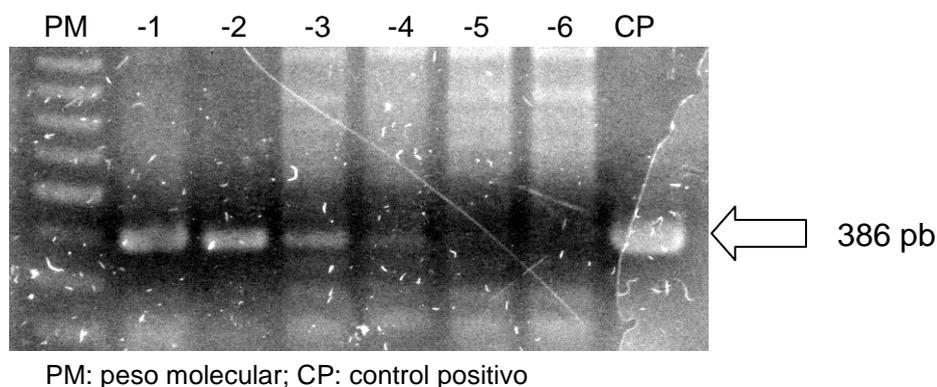


Tabla 2. Sensibilidad analítica de la prueba PCR en muestras de sangre, comparando ambos métodos de extracción.

Dilución	Bacterias Totales/mL	PCR Kit Fermentas®	PCR Kit Roche®
-1	2.730.000	-	+
-2	306.000	-	+
-3	28.000	-	+
-4	2.590	-	+
-5	249	-	-
-6	29,4	-	-

2. Análisis de sensibilidad en cultivos puros:

Luego de extraído el DNA, este se cuantificó en un espectrofotómetro U.V, obteniéndose los resultados ilustrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de DNA obtenido por kit Fermentas[®] y Roche[®], a partir de cultivos puros.

Kit	DNA ng/ μ L
Roche [®]	105
Fermentas [®]	8

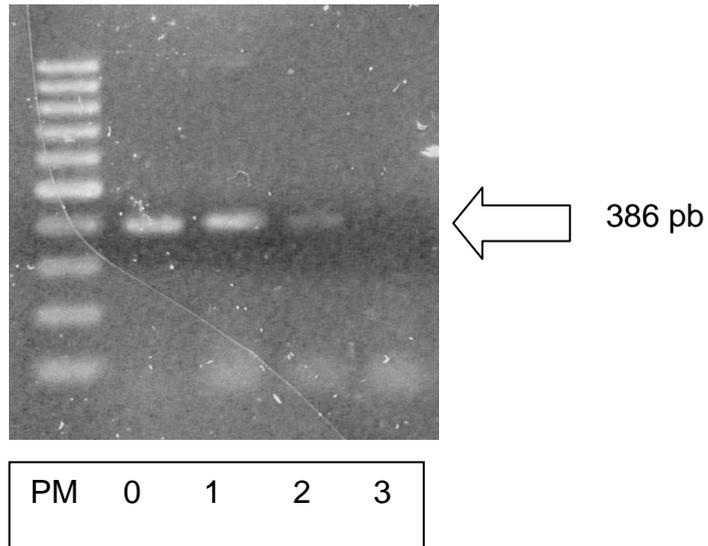
Se trabajó con el kit Roche[®] para determinar la sensibilidad de la prueba en cultivos puros realizando diluciones en base 100, como se puede apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4: Sensibilidad analítica de la prueba PCR a partir de cultivos puros mediante el kit Roche[®]

Dilución	DNA total ng/ μ L	PCR
0	105	+
1	0,105	+
2	0,000105	+
3	0,00000105	-

A continuación, en la Figura 2 se puede observar los resultados de éstas diluciones mediante electroforesis.

Figura 2. Sensibilidad analítica de la prueba PCR en cultivos puros



PM: peso molecular. 0-3, diluciones 0 a 3.

DISCUSIÓN

Al comparar los resultados de este estudio, con los obtenidos por Keid y *col* (9), estos se encuentran dentro de lo esperado, ya que la prueba PCR fue capaz de detectar la bacteria tanto en muestras de sangre como en cultivos puros.

Una situación importante observada en este estudio, fue la diferencia obtenida al comparar dos métodos de extracción, que en este caso son el kit Roche® y Fermentas®. El kit Roche® fue capaz de detectar DNA bacteriano en sangre, no así el kit Fermentas®. Se ha descrito que existen inhibidores de PCR tales como el grupo hemo presente en sangre, y EDTA y heparina al utilizarlos como anticoagulantes (12). La heparina es capaz de unirse a la Taq Polimerasa y el EDTA es capaz de quelar iones Mg^{+2} necesarios para la reacción (12). Es por esto que en este estudio la sangre fue recolectada en citrato de sodio como anticoagulante y en el caso del kit Fermentas®, al no obtener resultados positivos, se procedió a lavar y centrifugar la sangre repitiendo el procedimiento 5 veces (9) para evitar así la inhibición de la reacción, y aun así los resultados fueron desfavorables.

Al realizar la extracción, pero esta vez a partir de cultivos puros, nuevamente el kit Fermentas® mostró deficiencias en comparación con el kit Roche®. La cantidad de DNA bacteriano extraído, se encuentra muy por debajo de lo que es capaz de extraer Roche®. Además sólo fue capaz de detectar bacterias en la muestra sin diluir. Se ha indicado que cantidades de DNA total superiores a $4\mu g$, puede dar lugar a la inhibición de la reacción (12), sin embargo la cantidad de DNA utilizado era menor a $4\mu g$, lo que podría sugerir que los resultados poco satisfactorios se deben a una deficiente extracción por parte de los reactivos presentes en el kit Fermentas®.

Otra posible explicación a los malos resultados del kit Fermentas®, es un posible error humano al no poder visualizar las bandas presentes en el gel de agarosa luego de la electroforesis. Sin embargo, al comparar con las bandas claras y de fácil visualización con el DNA extraído a partir del kit Roche®, se descarta esta posibilidad.

Es por esto que es necesario verificar la eficiencia del método de extracción a utilizar en una prueba de PCR y que sea realmente capaz de detectar DNA bacteriano no solo a partir de cultivos puros, sino también a partir de muestras de sangre, y en general a partir del sustrato en que se desea hacer la detección.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la prueba de PCR es capaz de detectar DNA de *B. canis* tanto en sangre como en cultivos puros, y la sensibilidad analítica de la prueba en muestras de sangre y en cultivos puros es mayor a mayor a 249 bacterias/mL y mayor a 0,00000105 ng/ μ L (equivalente a 1,05 fg/ μ L) respectivamente. Por lo tanto es una prueba que puede ser considerada para el diagnóstico de brucelosis canina en muestras de sangre, pero su eficiencia diagnóstica va a depender del método de extracción utilizado y de un criterio cuidadoso por parte del profesional, debido a las características de bacteremia intermitente de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Consuelo Borie, del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva de FAVET, por facilitarnos equipos y cepas para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ARAS, Z.; UÇAN, U.S.**, 2010. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. *Theriogenology*, Artículo en Prensa, disponible en <http://www.sciencedirect.com>.
2. **BORIE, C.**, 2000. Brucelosis canina por *Brucella canis*. **In:** Tópicos en Reproducción en pequeños animales. De los Reyes,M.; Sánchez, A. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Santiago- Chile.pp :107-125
3. **BRICKER, B.J.**, 2002. PCR as diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* (90): 435-446
4. **CARMICHAEL, L.E.**, 1990. BRUCELLA CANIS **In:** Animal Brucellosis. Nielsen, K.H., Duncan, R.J. (Eds). CRC Press Boca Raton.Florida. USA. pp.336-350.
5. **CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GREPINET, O.**, 2000. An IS711 Element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (5): 835-839.
6. **ESTEIN,S.M.**, 1999. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis* [en línea] <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1999000100001&script=sci_arttext> [Consulta 12-11-2011].
7. **GÓMEZ, V.**, 2007. Seroprevalencia de brucelosis canina por *B. canis* en clínicas veterinarias del gran Santiago. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 47 p.
8. **HOLLET, R.B.**, 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance (Review). *Theriogenology* (66): 575-587.
9. **KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; CHIEBAO, D.P.; SALGADO, V.R.; MEGID,J.; RICHTZENHAIN, L.J.**, 2007a. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology* (67):1203-1210.
10. **KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VIEIRA, J.M.; SALGADO, V.R.; VASCONCELLOS, S.A.; DA COSTA, M.; GREGORI, F.; RIECHTZENHAIN, L.J.**, 2007b. Diagnosis of canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tets and PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Veterinary Research Comunnications* (31): 951-965.

11. **KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; CHIEBAO, D.P.; SALGADO,V.R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L.J.**, 2007c. A Polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. Theriogenology (68):1260-1270.
12. **KEID, L.B.; SOARES,R.M.;VASCONCELLOS, S.A.; SALGADO, V.R.; JMEGID, J.;RICHTZENHAIN, L.J.**, 2010d. Comparison of a PCR assay in whole blood an serum specimens for canine brucellosis diagnosis. Veterinary Record (167): 96-99
13. **MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; DE DIOS COLMENERO, J.** 1998. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. Journal of Clinical Microbiology (36): 2443-2446
14. **SHIN, S.J; CARMICHAEL, L.E.**, 1999. Brucelosis canina causada por *Brucella canis*. [en línea] <http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/shin_es/ivis.pdf> [Consulta 09-08-2010].
15. **WANKE, M.M.**, 2004. Canine brucellosis (Review). Animal Reproduction Science (82-83): 195-207.