

Imunodifusão em gel de agar e soroaglutinação rápida para a detecção de anticorpos *Anti-Brucella canis*

Agar-gel immunodiffusion and rapid slide agglutination on canine brucellosis diagnosis

MORAES, Carla Cristina Guimarães de^{1*}; MEGID, Jane²; SOUZA, Luiz Carlos de²; MENESES, Andre Marcelo Conceição³; CROCCI, Adalberto José⁴; SANTOS, Rosely Bianca⁵

¹Universidade Federal do Pará, Faculdade de Medicina Veterinária, Central de Diagnóstico Veterinário, Castanhal, Pará, Brasil.

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Belém, Pará, Brasil.

⁴Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Estatística, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁵Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, São Paulo, Brasil.

*Endereço para correspondência: ccmoraes@ufpa.br

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar as técnicas de soroaglutinação rápida em cartão (SAR) e de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), para o diagnóstico de brucelose canina em soros de cães submetidos ou não ao tratamento com 2-Mercaptoetanol. Dos 1.072 soros de cães examinados no estudo, verificaram-se reações positivas em 202 na prova de IDGA (18,84%), 9 na prova de IDGA 2-ME (0,84%); 19 na prova de SAR (1,77%) e 9 na prova de SAR 2-ME (0,84%). A avaliação estatística dos resultados comprovou não haver diferença significativa entre os testes de SAR, SAR 2-ME e IDGA 2-ME, porém diferiram significativamente das obtidas no teste de IDGA.

Palavras-chave: *Brucella canis*, diagnóstico, cão, brucelose, sorologia

INTRODUÇÃO

A brucelose canina é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica causada pelo agente etiológico *Brucella canis* (*B.*

SUMMARY

The rapid slide agglutination test (SAT) was compared to the agar gel immunodiffusion test (AGID) for the canine brucellosis diagnosis in sera submitted or not to the treatment with 2-Mercaptoetanol. Among the 1,072 sera dogs examined in the study, 202 were positive by AGID test (18.84%), 9 by AGID 2-ME test (0.84%), 19 in the race for SAT (1, 77%) and 9 in the race for SAT 2-ME (0.84%). The statistical evaluation of the results showed no significant difference among the tests of SAT, SAT 2-ME and AGID 2-ME, but differed significantly from AGID test.

Keywords: *Brucella canis*, diagnostic, dog, brucellosis, serology

canis) e que acomete canídeos domésticos e silvestres. A infecção tem ampla distribuição mundial e importante potencial zoonótico, pois machos e fêmeas são igualmente susceptíveis. A transmissão natural de *B. canis* em

machos ocorre por meio do sêmen e da urina, enquanto as fêmeas portadoras podem transmitir naturalmente o agente durante o estro, o acasalamento ou logo após episódios de abortamento (CARMICHAEL & KENNEY, 1970; JOHNSON & WALKER, 1992, CARMICHAEL & GREENE, 1993, WANKE, 2004).

Em cães a detecção da *B. canis* em secreções orgânicas ou tecidos são fatores imprescindíveis para confirmação do diagnóstico da enfermidade. Contudo, a presença da bactéria na circulação sanguínea ocorre de maneira intermitente e este fator implica selecionar o material e o período mais adequado para a pesquisa do agente (JOHNSON & WALKER, 1992).

Lisle & Carmichael (1974) desenvolveram e avaliaram a prova de aglutinação rápida em placa (SAR) para detectar anticorpos anti-*B. canis*. A prova é menos complexa e detecta anticorpos da 8^a a 12^a semana pós-infecção até um período mínimo de três meses após a bacteremia (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON & WALKER, 1992). Na tentativa de reduzir a taxa de reações falso-positivas, a soroaglutinação rápida foi modificada para incluir um breve tratamento do soro com 2-Mercaptoetanol (2-ME) 0,2M, o que inibiria as imunoglobulinas M (IgM) responsáveis pelas reações inespecíficas sem, no entanto, causar perda de sensibilidade do teste (CARMICHAEL, 1990; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI, 1993). Essa técnica tem a vantagem de possibilitar detecção dos títulos em 3 a 4 semanas pós-infecção e tem baixa porcentagem (1%) de resultados falso-negativos (JOHNSON & WALKER, 1992).

A prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com antígeno de parede celular é capaz de detectar a presença de

anticorpos a partir da 6^a ou da 12^a semana após a infecção e esses anticorpos podem persistir por muitos anos (CARMICHAEL, 1990; JOHNSON & WALKER, 1992; BERTHELOT & GARIN-BASTUJI, 1993). Esse teste é mais específico que a SAR-2ME, porém não anula a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas com outros microrganismos (JOHNSON & WALKER, 1992).

Considerando a importância do diagnóstico eficiente da enfermidade, este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar as técnicas de soroaglutinação rápida em cartão e de imunodifusão em gel de ágar em soros submetidos ou não ao tratamento com 2-Mercaptoetanol e avaliar sua utilização como rotina diagnóstica em clínicas veterinárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 1.072 amostras de soro de cães domiciliados; 890 de área urbana, 146 de zona rural e 36 de área mista (urbana e rural), de ambos os sexos (645 machos e 427 fêmeas), de raça variável e faixa etária de um mês a maiores de quatro (4) anos, pertencentes à microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo. Concomitantemente à coleta de sangue, em breve entrevista, todos os voluntários participantes do projeto responderam a um questionário sobre origem, sexo, raça e vida reprodutiva dos animais (Figura 1).

As amostras de sangue foram coletadas assepticamente da veia cefálica ou jugular em tubos a vácuo (Vacutainer[®]), obtendo-se, após a retração do coágulo o soro sanguíneo, que foi acondicionado em microtubos plásticos (Eppendorf[®]) e armazenados a -20°C até a realização das provas.

Figura 1. Questionário aplicado aos proprietários dos animais durante a colheita de sangue na Microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, 2005

1-Nome do animal: _____
2.Idade do animal: _____
3-Sexo do animal: _____
4-Raça do animal: _____
5-Nome do Proprietário: _____
6-Endereço: _____
7-Município: _____
8-Vida Reprodutiva do Animal:
() copulou () não copulou
8.1-Para fêmeas:
() Prenhes () Prenhes não relatada
() Abortou () Não abortou Quantos: _____
Qual o período do aborto? _____
9-Houve caso de aborto com outras fêmeas da casa? _____
11-Tem acesso a rua com frequência: () Sim () Não
12-Vive em: () Zona Urbana () Zona Rural () Zona Mista
13-Número do animal no frasco: _____

Para as provas de IDGA e Imunodifusão em gel de ágar com 2-ME (IDGA-2ME), utilizou-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198, constituído de parede celular bacteriana, produzido pelo Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR). Na realização desses testes, foi cumprido o protocolo recomendado pelo TECPAR.

Os soros reagentes positivos (soro padrão) foram depositados nos orifícios superiores e inferiores ao orifício central, os soros a testar foram depositados nos quatro orifícios laterais e no orifício central foi depositado o antígeno. As placas foram mantidas no interior de uma câmara úmida, em estufa de 20 e 25°C (Figura 2).

As leituras foram realizadas utilizando-se sistema de iluminação indireta em fundo escuro nos períodos de 24, 48 e 72 horas, considerando resultado final aquele observado na leitura de 72 horas. A interpretação foi feita observando-se a formação de linha de precipitação entre o soro teste e o antígeno e classificando as amostras em positivas ou negativas. Foi considerado positivo o soro cuja linha de precipitação apresentou identidade com a linha formada pelo soro padrão e negativo aquele em que não houve formação de linha de precipitação.

Quando a linha formada não teve identidade com a do soro padrão (linha inespecífica), a amostra foi considerada negativa.

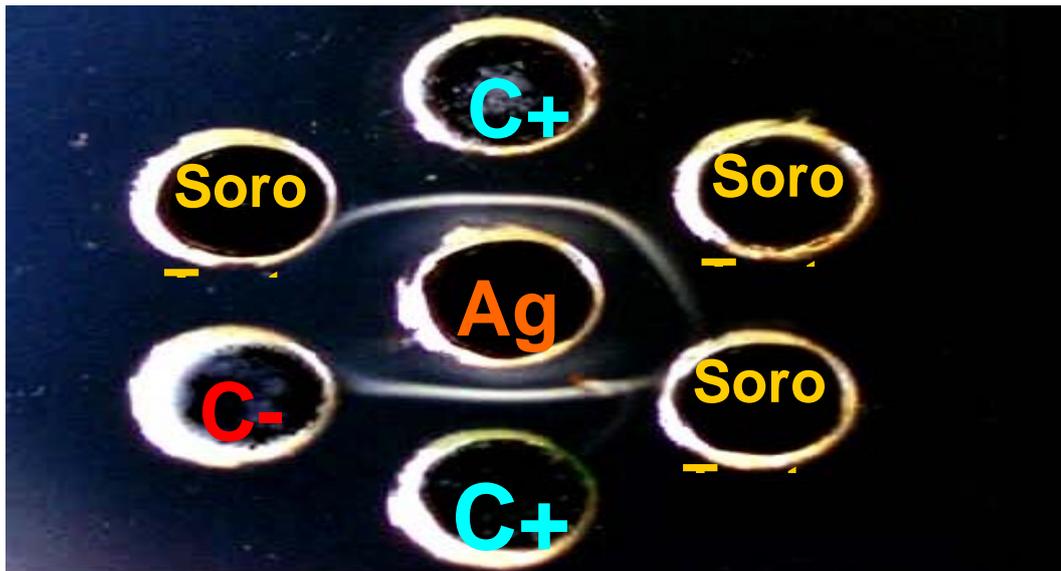


Figura 2. Reação positiva (orifício superior da direita) em soro de um cão com *B. canis* no teste de imunodifusão em gel de ágar

Considerou-se fraco positivo o soro cuja linha de precipitação apresentou inclinação muito próxima do orifício do soro a testar. Para fins estatísticos e de comparação entre as provas, os soros fraco positivo na prova IDGA foram considerados positivos.

Com base em Lisle & Carmichael (1974), para inibir reações inespecíficas, todos os soros foram submetidos à diluição de 0,2M de 2 mercaptoetanol (1,41 mL de 2-mercaptoetanol para 100 mL de água destilada). Dessa forma, à quantidade de 100 microlitros (μL) de soro adicionaram-se 100 μL da solução de 2 mercaptoetanol, que foram mantidos em reação durante 30 minutos e submetidos a interpretação de forma idêntica à IDGA descrita anteriormente. As provas de SAR e soroaglutinação rápida com 2-ME (SAR-2ME) foram realizadas utilizando-se como antígeno *Brucella ovis* inativada e corada com rosa Bengala, produzido pela *Synbiotics Corporations*, comercialmente conhecido como *Canine Brucellosis*

Antibody Test Kit - D-Tec[®]CB (Figura 3).

A soroaglutinação rápida foi realizada de acordo com orientações do laboratório produtor do antígeno. O teste consiste na reação de 30 μL de soro a testar frente a 30 μL do antígeno. Após homogeneização por 10-15 segundos e repouso por período complementar à reação final de dois minutos, observou-se a presença ou a ausência de grumos, caracterizando positividade ou negatividade da reação. O controle do teste foi realizado avaliando-se paralelamente a reação no soro controle positivo que compõe o *kit* diagnóstico. Nos soros em que não se observou a presença de aglutinação, o animal foi considerado livre de infecção por *B. canis*. Os soros que resultaram positivos foram então submetidos à soroaglutinação rápida com 2 mercaptoetanol em cartão (SAR-2ME) conforme recomendações do fabricante do teste (Figura 4).



Figura 3. *Canine brucellosis antibody Test kit* (D-Tec[®] CB), utilizado na prova de soroprecipitação rápida, constituído de antígeno (frasco B), soro controle positivo (frasco A), solução de 2-ME (frasco C), pipetas para soro a testar, bastões para homogeneização e cartões com quatro círculos para realização do teste

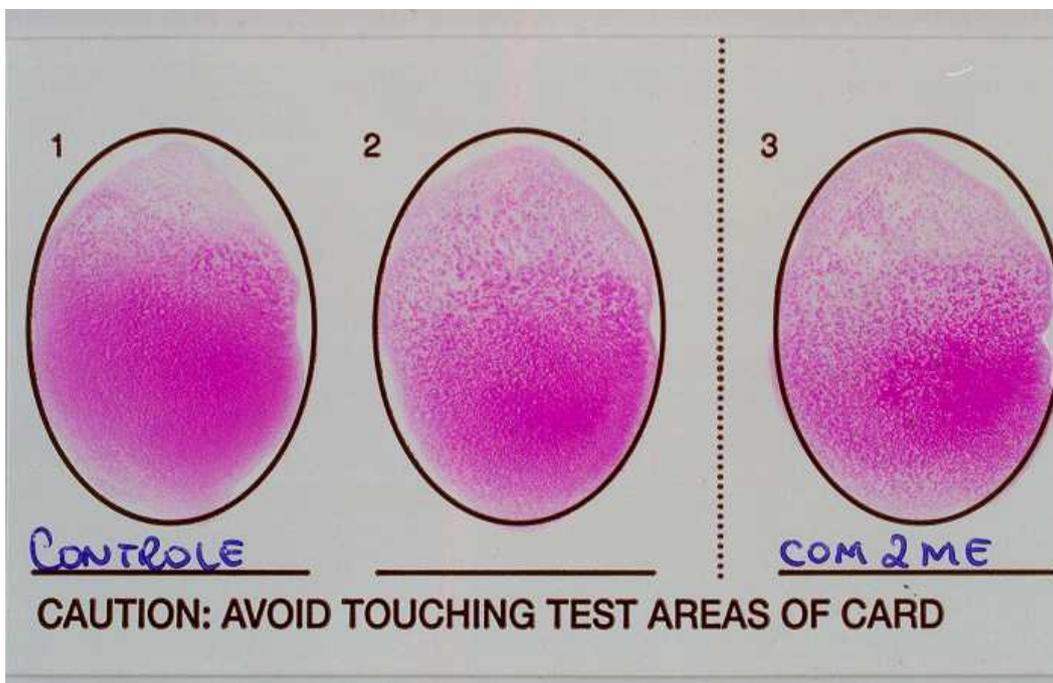


Figura 4. Reação positiva de soroprecipitação rápida em soro controle (Círculo 1), em soro de cão positivo (Círculo 2) e em soro positivo do mesmo cão tratado com 2 mercaptoetanol (Círculo 3)

Em microtubo plástico de 200 µL, foram colocadas duas gotas do soro que apresentou aglutinação e acrescentadas duas gotas da solução de 2-mercaptoetanol que acompanha o *kit*. Após a homogeneização, depositou-se uma gota dessa mistura em um círculo do cartão e adicionou-se uma gota do antígeno, homogeneizando-as por um período de 10-15 segundos em uma superfície plana. Depois de dois minutos, foi realizada a leitura para identificar a presença ou ausência de grumos, de forma idêntica à SAR.

Todas as provas foram realizadas no Laboratório Aplicado nas Enfermidades Infecciosas, da (FMVZ – UNESP/Botucatu).

Os métodos foram comparados pelo teste estatístico de Cochran (ZAR, 1996), para amostras dependentes, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade. São apresentados também valores do coeficiente Kappa por ALTMAN, (1991) para estudo de concordância entre os métodos dois a dois. A interpretação desses valores foi feita segundo o critério: valores $0 < k < 0,40$ (baixa concordância); $0,40 < k < 0,60$ (concordância moderada) e para $k > 0,60$ (boa concordância), entre os métodos avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rotina diagnóstica, para os casos que envolvem cães suspeitos de infecção por *B. canis*, utiliza com frequência os métodos sorológicos como suporte laboratorial, por constituírem técnicas rápidas e de fácil execução (CARMICHAEL & GREENE, 1993). Por isso, a disponibilidade dos testes sorológicos confiáveis tem sido

fundamentalmente avaliada no diagnóstico correto dessa enfermidade.

Nos últimos anos verificaram-se um crescente aumento nas suspeitas clínicas da infecção de cães por *B. canis*, sendo que as primeiras desordens reprodutivas associadas a ação desta bactéria foram descritas em animais que habitavam canis comerciais (CARMICHAEL, 1969). Em virtude das dificuldades agregadas ao diagnóstico direto do agente, as provas sorológicas assumiram um importante papel nas pesquisas epidemiológicas a cerca desta enfermidade em cães. A discussão sobre a temática do diagnóstico indireto da brucelose canina, geralmente provoca opiniões conflitantes, principalmente no que concerne a sensibilidade e a especificidade de cada teste sorológico.

De acordo com um estudo comparativo realizado entre as provas sorológicas empregadas no diagnóstico da brucelose canina e a técnica de *Polymerase Chain Reaction*, Megid et al. (2008) concluíram que resultados positivos nas técnicas sorológicas são suficientes para indicar a ocorrência da infecção por *B. canis*. Com base neste argumento, este trabalho comparou as técnicas de IDGA, IDGA-2ME, SAR e SAR-2ME para a pesquisa de aglutininas contra *B. canis* em 1.072 soros de cães assintomáticos oriundos dos 11 municípios que constituem a microrregião da Serra de Botucatu/São Paulo, com a finalidade de demonstrar a existência de um método de fácil execução e capaz de gerar resultados confiáveis precocemente.

Das 1.072 amostras incluídas nesta investigação, 202 apresentaram-se reagentes à prova de IDGA (18,84%), 9 à prova de IDGA-2ME (0,84%), 19 à de SAR (1,77%), e 9 à de SAR-2ME (0,84%), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados comparativos da prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com imunodifusão em gel de ágar com soro tratado com 2-mercaptoetanol (IDGA-2ME), sorologia rápida em cartão (SAR) e sorologia rápida em cartão em soros tratados com 2-mercaptoetanol (SAR 2-ME) de cães da microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, 2005

Teste	IDGA-2ME			SAR			SAR-2ME			
	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total	
IDGA	+	9	193	202	10	192	202	4	198	202
	-	0	870	870	9	861	870	5	865	870
Total		9	1063	1072	19	1053	1072	9	1063	1072

Resultados diferentes, no entanto, foram descritos por Aguiar et al. (2005) e Vasconcelos et al. (2008), que observaram 3,6% e 2,35% respectivamente de amostras reagentes na prova de IDGA. Contudo, estes soros não foram testados pelo método de IDGA-2ME, que é considerado mais específico que a IDGA, assim esses achados conduzem a uma possível ocorrência da enfermidade em cães na região de Montenegro/RO e Campina Grande/PB respectivamente, porém não se pode descartar a hipótese da identificação de reações inespecíficas pela técnica empregada.

Entre os achados deste estudo observou-se discordância na porcentagem de positivos, entre as provas de IDGA (18,84%) e SAR (1,77%). Essa variação de positividade nas duas provas difere do resultado relatado por Iribarren et al. (1999), que descreveram, respectivamente, 13,4% e 14% de positividade nas mesmas provas. Esses autores realizaram estudo sorológico com cães de canil que apresentavam problemas de infertilidade, aborto e mortalidade de fetos, enquanto que neste estudo foram utilizados animais sem sintomatologia clínica. Do mesmo modo Cavalcanti et al. (2006) também relataram resultados discordantes aos encontrados neste trabalho, pois

observaram 5,88% de soros positivos utilizando apenas a prova de IDGA, enquanto que esta pesquisa mostrou 18,84% de animais considerado positivos nesta técnica.

Os resultados das provas de IDGA-2ME e SAR-2ME, expressos na Tabela 2, apresentaram proporções iguais a 0,84% (nove positivos), correspondente a quatro animais positivos em ambas as provas, cinco positivos à IDGA-2ME e negativos à SAR-2ME e cinco negativos à IDGA-2ME e positivos à SAR-2ME.

Todos os soros positivos nas provas com 2ME (IDGA-2ME e SAR-2ME) foram igualmente positivos sem tratamento com 2ME (IDGA e SAR), e o mesmo ocorreu com os resultados negativos. Desse modo, os resultados obtidos neste trabalho refletem a ação lítica do 2ME sobre as pontes dissulfídicas da molécula de IgM, demonstrando que a adição desse componente de desnaturação confere aos testes diagnósticos considerável aumento de especificidade sem comprometer sua sensibilidade e, conseqüentemente reduz a ocorrência de reações inespecíficas.

Os resultados comparativos entre os testes de SAR e SAR-2ME demonstram 98,23% de resultados concordantes negativos e 0,84% de resultados

concordantes positivos entre as duas provas e estes valores estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Resultados comparativos da prova de imunodifusão em gel de ágar com soro tratado com 2-mercaptoetanol (IDGA-2ME) com as provas de soroglutinação rápida em cartão (SAR) e soroglutinação rápida em cartão em soros tratados com 2-mercaptoetanol (SAR 2-ME) de cães da microrregião da Serra de Botucatu , São Paulo, 2005

Teste		SAR			SAR-2ME		
		+	-	Total	+	-	Total
IDGA-2ME	+	4	5	9	4	5	9
	-	15	1048	1063	5	1058	1063
Total		19	1053	1072	9	1063	1072

Tabela 3. Resultados comparativos da prova de soroglutinação rápida em cartão (SAR) e soroglutinação rápida em cartão com 2 mercaptoetanol (SAR-2ME) em soros de cães da microrregião da Serra de Botucatu , São Paulo, 2005

Teste		SAR-2ME		
		+	-	Total
SAR	+	9	10	19
	-	0	1053	1053
Total		9	1063	1072

Estatisticamente, os resultados 0,0705; 0,0602 e 0,0220 do coeficiente kappa (k) indicaram baixa concordância entre os métodos avaliados de IDGA e IDGA-2ME, IDGA e SAR, e IDGA e SAR-2ME, respectivamente (Tabela 1). Igualmente na tabela 2, encontramos $k = 0,2760$ evidenciando também uma baixa concordância entre os métodos de IDGA-2ME e SAR, entretanto esta mesma tabela identifica um valor de $k = 0,4401$ apontando para a moderada concordância entre os métodos de IDGA-2ME e SAR-2ME. Sob a mesma ótica, o valor de $k = 0,6404$ revela boa concordância entre as técnicas de SAR e SAR-2ME, conforme demonstrado na tabela 3. Resultados semelhantes foram observados por Azevedo et al. (2004), onde ambas pesquisas descreveram a análise pelo índice Kappa, indicando

uma baixa concordância entre os dois métodos.

Os resultados positivos à SAR-2ME e negativos à IDGA podem ser justificados pela menor sensibilidade da IDGA na detecção da fase aguda da doença. Contrariamente, os resultados positivos à IDGA-2ME e negativos à SAR-2ME podem ser decorrentes do melhor desempenho da IDGA, em relação a SAR, para detectar animais cronicamente infectados, em virtude da presença de estruturas antigênicas citoplasmáticas (JOHNSON & WALKER, 1992) adicionalmente às de parede celular no antígeno (comunicação pessoal com Dr. Jorge Bacillar Agottani).

A discordância de resultados na IDGA, em comparação às demais provas, pode ser esclarecida por reações cruzadas

com outras Brucellas, em razão da presença de estruturas antigênicas citoplasmáticas comuns ao gênero (CARMICHAEL, 1990), aspecto não avaliado neste estudo.

Reações discrepantes em soros tratados com 2ME foram observadas em ambas as técnicas (SAR-2ME e IDGA-2ME) e não se correlacionaram a sintomas e histórico da enfermidade. Em razão da ausência de isolamento bacteriano, não seria cabível a afirmação de maior confiabilidade entre as duas técnicas, porém, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, não há diferença estatística entre elas.

Embora com a possibilidade de diluição sérica, a realização da prova de IDGA-2ME visando à confirmação dos resultados obtidos na IDGA apresentou melhores resultados, uma vez que a análise estatística não caracterizou diferença de resultados entre elas e as provas de SAR e SAR-2ME, que, no entanto, diferem da IDGA.

Existe complexidade na realização de sorodiagnóstico da Brucelose canina, em decorrência da variação dos resultados nas diferentes provas.

A disparidade destes resultados pode ser produto da ação direta de fatores, inerentes ao indivíduo e/ou ao protocolo laboratorial, que interferem na complexa interpretação que envolve o diagnóstico sorológico da brucelose em cães.

A melhor concordância entre a SAR e SAR-2ME caracteriza-as como provas de triagem para o diagnóstico da brucelose canina, porém o alto custo inviabiliza o uso rotineiro desses testes no diagnóstico da doença.

Os soros positivos na IDGA devem ser submetidos à prova de IDGA-2ME, que é uma técnica de baixo custo e de igual sensibilidade, porém possui maior especificidade

A adição de 2-mercaptoetanol reduz a ocorrência de reações inespecíficas nas

provas sorológicas contudo, mais pesquisas devem ser conduzidas para comprovar a suscetibilidade dos testes aos fenômenos inespecíficos na presença de 2-ME.

Os resultados obtidos representam indícios da circulação de *B. canis* na população estudada. Contudo, diante da ausência de uma metodologia diagnóstica definitiva não é pertinente afirmar a presença da infecção pela bactéria nestes animais, mesmo com a utilização de provas sorológicas altamente específicas para a enfermidade.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; VASCONCELLOS, S.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R.; CRUZ, T.F.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; SILVA, J.C.R.; MORAES, Z.M.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do município de Montenegro, Rondônia, Brasil. **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1216-1219, 2005. [[Links](#)].

ALTMAN, D.G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall, 1991. [[Links](#)].

AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; KEID, L.B.; GRASSO, L.M.P. S.; PINHEIRO, S.R.; MASCOLLI, R.; ALVES, C.J. Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n2, p.106-112, 2004. [[Links](#)].

BERTHELOT, X.; GARIN-BASTUJI, B. Canine Brucellosis. **Le Point Veterinaire**, v.25, p.33-37, 1993. [[Links](#)].

CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. **Proc. Annu. Meet. U. S. Livest. Sanit. Assoc.**, v. 71, p. 517-27, 1969. [[Links](#)].

CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: The clinical disease, pathogenesis and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.156, p.1726-34, 1970. [[Links](#)].

CARMICHAEL, L. E. *Brucella canis*. In: NIELSEN, K.; DUCAN, J.R. **Animal Brucellosis**. Boston: CRC Press, 1990, p. 335-350. [[Links](#)].

CARMICHAEL, L.E.; GREENE, G.E. Brucellosis canina. In: GREENE, G.E. **Enfermedades infecciosas perros y gatos**. México: Interamericana Mc Graw Hill, 1993. p.604-616. [[Links](#)].

CAVALCANTI, L.A.; DASSO, M.G.; OLIVEIRA, F.C.S.; VIEGAS, S.A.R.A.; ALMEIDA, M.G.A.R.; ANUNCIAÇÃO, A.V.M.; ALCANTARA, A.C.; BITTENCOURT, D.V.V.; OLIVEIRA, E.M.D. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.7, n.2, p.176-180, 2006. [[Links](#)].

IRIBARREN, F; BREGLIA J.; CASTILLO, M.; ESCOBAR, V; HOFFMAN, F.; MARTICORENA, D.; MORAS, Y.E.V. Comparación de las pruebas de Inmunodifusión del gel de agar con antígeno de *Brucella ovis* y aglutinación en placa con *Brucella canis* M (-) para el diagnóstico de la brucelosis canina. **Veterinaria Argentina**, v.16, n.152, p.147-50, 1999. [[Links](#)].

JOHNSON, C.A., WALKER, R.D. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.14, p.763-772, 1992. [[Links](#)]

LISLE, G.W.; CARMICHAEL, L.E. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.905-909, 1974. [[Links](#)].

MEGID, J.; SALGADO, V.R.; KEID, L.B.; SIQUEIRA, A.K.; CRUZ, T.F.; GRINSPAN, J.; LISTONI, F.J.P.; PAES, A.C. Abortamento canino por *Brucella canis*: relato de caso. **Veterinaria e Zootecnia**, v.15, n.3, p.445-448, 2008. [[Links](#)].

WANKE, M.M. Canine brucellosis. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.195-207, 2004. [[Links](#)].

ZAZ, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718p. [[Links](#)].

Data de recebimento: 21/08/2008

Data de aprovação: 26/01/2009