

Brucelosis en caninos vagabundos de un sector de la ciudad de Talca, Chile

Brucellosis in stray dogs from a sector of the city of Talca, Chile

Romy Weinborn A.^{1*}, Macarena Zanelli², Carolina Liendo², Francisco Celis², Sara Olmedo², Francisco Sánchez³, Pedro Ábalos³, Ignacio Troncoso^{2,4}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de *Brucella canis* en una población de caninos vagabundos mediante diferentes técnicas diagnósticas disponibles en Chile y evaluar su nivel de concordancia. Se tomaron muestras de sangre y se colectaron los testículos de 30 caninos vagabundos de un sector de la zona oriente de la ciudad de Talca, los mismos que fueron parte de una campaña de esterilización del gobierno chileno. Para considerar positivo a *B. canis* a un individuo se consideraron como mínimo dos técnicas serológicas positivas. Se realizó examen clínico y las muestras de sangre fueron analizadas mediante ELISA comercial, inmunocromatografía (ICT), contraelectroforesis (CIEF) y ELISA indirecto (ELISA-I) con lipopolisacárido rugoso (LPS-R), además de histopatología testicular. Se encontró 6.6% (2/30) de individuos positivos, mientras que, la concordancia, según análisis *Kappa*, fue sin acuerdo o pobre (-0.136 a

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Universidad de las Américas, campus Maipú, Santiago, Chile

² Facultad de Recursos Naturales y Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Chile

³ Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Universidad de Chile, Santiago, Chile

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Universidad de las Américas, campus Chacabuco, Concepción, Chile

* E-mail: rweinborn@udla.cl

Recibido: 14 de diciembre de 2022

Aceptado para publicación: 9 de julio de 2023

Publicado: 25 de agosto de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

-0,023), leve (0.023 a 0.132), justa (0.071-0.380) y moderada (0.464) entre las técnicas utilizadas. Se concluye que existen caninos que deambulan libremente por la ciudad con o sin signología clínica y con seropositividad o histopatología compatible a brucelosis, pudiendo ser un problema de salud pública. La concordancia entre técnicas serológicas e histopatológica indicó que se debe realizar más de una técnica diagnóstica, recomendándose el uso de técnicas confirmatorias (CIEF y ELISA-I *B. canis* con LPS-R) o el uso combinado de ICT con ELISA comercial. No se recomienda la histopatología como prueba diagnóstica o única.

Palabras clave: brucelosis, *Brucella canis*, caninos, zoonosis, Chile

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of *Brucella canis* in a population of stray canines using different diagnostic techniques available in Chile and to evaluate their level of concordance. Blood samples were taken and the testicles of 30 stray canines from a sector of the eastern zone of the city of Talca were collected, which were part of a sterilization campaign by the Chilean government. To consider an individual positive for *B. canis*, at least two positive serological techniques were considered. Clinical examination was performed, and blood samples were analyzed by commercial ELISA, immunochromatography (ICT), counterimmunoelectrophoresis (CIEF), indirect ELISA (ELISA-I) with rough lipopolysaccharide (LPS-R), as well as testicular histopathology. The results showed that 6.6% (2/30) of positive individuals, while the concordance, according to the Kappa analysis was without agreement or poor (-0.136 to -0.023), slight (0.023 to 0.132), fair (0.071-0.380) and moderate (0.464) among the techniques used. It is concluded that there are canines that roam freely around the city with or without clinical signs and with seropositivity or histopathology compatible with brucellosis, which could be a public health problem. The concordance between serological and histopathological techniques indicated that more than one diagnostic technique should be performed, recommending the use of confirmatory techniques (CIEF and ELISA-I *B. canis* with LPS-R) or the combined use of ICT with commercial ELISA. Histopathology is not recommended as a diagnostic or sole test.

Key words: brucellosis, *Brucella canis*, canine, zoonoses, Chile

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, causada por bacterias del género *Brucella*. Entre estas, *B. canis* afecta a los caninos y genera altas pérdidas económicas en criaderos (Ji-Youl Jung *et al.*, 2020). Según Troncoso *et al.* (2013) se reportan prevalencias de 7.3% en Argentina, 19.9% en Brasil y 15.9% en Perú. En Chile fue re-

portada en caninos por primera vez en 1978 y en los últimos años se indican prevalencias entre 7 a 20% (Sánchez, 2007; Troncoso *et al.*, 2013; Sánchez, 2017; Galarce *et al.*, 2020).

La brucelosis canina tiene una mayor presentación en los criaderos, pero también afecta a animales con propietario y/o de vida libre (Sánchez, 2007; Pardo *et al.*, 2009). Dentro de los antecedentes nacionales, se

encontró una positividad de 6% en una población canina de criadero (Borie *et al.*, 2019a), de 2% en centros de rescate caninos, y de 16.8% en caninos que no eran de criadero de la Región Metropolitana, mediante la técnica de contraelectroforesis (CIEF) (Gómez, 2007; Borie *et al.*, 2019b). Asimismo, en caninos vagabundos en Talca se reportó 7% de seropositividad por medio de inmunocromatografía (ICT) (Celis, 2013), y de 8.7% en un estudio con 449 perros clínicamente sanos y con dueño de 34 comunas del Gran Santiago, utilizando la técnica de ELISA-I B. canis con LPS-R (Sánchez, 2017). En fecha más reciente, Galarce *et al.* (2020) reportaron 7% de seroprevalencia en caninos con o sin dueño de la Región Metropolitana.

Si bien existen técnicas serológicas con diversa eficiencia para el diagnóstico de esta enfermedad (Galarce *et al.*, 2020), el diagnóstico definitivo se obtiene mediante el aislamiento microbiológico. No obstante, dado que la bacteria se elimina de forma intermitente es posible obtener falsos negativos (Ardoino *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2009). Además, es necesario contar con instalaciones de bioseguridad adecuadas a nivel 3 y personal capacitado para ello (Ji-Youl Jung *et al.*, 2020). Los métodos de amplificación de ADN han demostrado ser confirmatorios en el diagnóstico de la enfermedad, aunque también son complicados de realizar por la naturaleza del agente etiológico y el alto costo (Carmichael y Shin, 1996; Olivera *et al.*, 2011; Galarce *et al.*, 2020). Por otra parte, existe la prueba de histopatología, la cual puede ser realizada en los machos desde tejido testicular, donde las muestras son teñidas con Hematoxilina Eosina (H-E) para la visualización general del tejido testicular y con ácido Peryódico Schiff (PAS) para teñir las membranas basales, especialmente a nivel tubular (Borie *et al.*, 2002).

Sumado a la dificultad diagnóstica que representa esta enfermedad, existe en Chile un alto número de caninos que pueden ac-

tuar como población susceptible de enfermar y convertirse en potenciales portadores asintomáticos. Se debe considerar el elevado número de caninos vagabundos y de tutores de canes que permiten que salgan a las calles sin supervisión (SUBDERE, 2022). Este tipo de tenencia de mascotas facilitarían el contagio entre caninos y a la vez permitiría contagiar a personas que puedan tener contacto con estos animales. Por último, en la zona centro sur del país existen pocos antecedentes epidemiológicos de la enfermedad, de allí que el objetivo de la presente investigación fue determinar la prevalencia de *B. canis* en una población de caninos vagabundos por medio de diferentes técnicas disponibles en Chile y evaluar el nivel de concordancia entre ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de enfoque cuantitativo, de alcance descriptivo y corte transversal, fue realizado mediante un muestreo dirigido y por conveniencia a 30 caninos vagabundos de un sector de la zona oriente de la ciudad de Talca, Región del Maule, Chile. Como criterios de inclusión se consideraron canes macho que deambulaban en forma libre por la vía pública y sin identificación (collares o microchip). Los caninos eran parte de una campaña de esterilización del gobierno chileno amparada por la Ley de Tenencia Responsable N.º 21020 (Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, 2017).

Previo a la toma de la muestra, se realizó un examen clínico general a cada animal, y se llenó una ficha clínica consignando la presencia de signos compatibles con la enfermedad (orquitis, dermatitis húmeda escrotal, atrofia testicular y/o dolor a la palpación) (Nelson y Couto, 2019). La muestra de sangre (tubo tapa roja) de 4 ml se obtuvo mediante punción de la vena cefálica externa. La muestra fue centrifugada a 1512 g durante 5 min y el suero resultante fue depositado en tubos Eppendorf y conservados a -

20 °C. En el procedimiento quirúrgico para la castración se colectaron los testículos, que fueron almacenados en formalina diluida al 10%.

Los canes fueron considerados como positivos a *B. canis* si fueron positivos a por lo menos dos técnicas serológicas. Las técnicas llevadas a cabo fueron:

- Inmunocromatografía (Anigen Rapid C. *Brucella* Ab. Test Kit®, Bionote) (anticuerpos IgM). Sensibilidad igual o mayor al 90% y especificidad 90.1% (Castillo *et al.*, 2002) y fue realizada según instrucciones del fabricante y procesadas en el hospital clínico veterinario docente de la Universidad Santo Tomás (HCVD UST). La prueba fue considerada positiva cuando se observó la presencia de dos bandas de color (la banda T y la banda C) en la ventana del kit, sin importar la banda que aparezca primero (Bionote, 2016).
- ELISA comercial (ImmunoComb® Biogal, Israel). Sensibilidad de 98% y especificidad de 93% (Chinyoka *et al.*, 2014). La prueba fue procesada en HCVD UST, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron consideradas como negativas para S0, S1 y S2, el punto de corte fue S3 equivalente a título de anticuerpos IgG de 1:200 por inmunofluorescencia indirecta (IFA). Se consideraron como positivas S3- S6 (Biogal Galed Laboratories Acs Ltd, 2018).
- Contraelectroforesis (CIEF). Sensibilidad de 100% y especificidad mayor al 95% (Sánchez, 2007). La prueba fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). La técnica estandarizada es una serología que utiliza antígeno lipopolisacárido rugoso de *Brucella ovis*. Las muestras se preparan en portaobjetos con agarosa al 1% en buffer barbital sódico pH 8.6, con pocillos equidistantes entre sí. Las lecturas de bandas de precipitación se realizó previa inmersión de citrato de sodio al 5% para eliminar reacciones inespecíficas (Borie *et al.*, 2002).
- ELISA indirecto (ELISA-I *B. canis* con lipopolisacárido rugoso (LPS-R)). Sensibilidad de 97.5% y especificidad de 97.3% (Meza *et al.*, 2012). Los sueros fueron procesados en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina Preventiva Animal de FAVET. La prueba de ELISA Indirecto (ELISA-I) se realizó en placas de poliestireno del tipo NUNC Polysorp, utilizando como controles positivos y negativos muestras diagnosticadas por CIEF, de acuerdo con las condiciones propuestas por Meza (2011), con algunas modificaciones. Los resultados se obtienen a través de un equipo INMUNOSKAN Plus® con un filtro de 405 nm. Para la interpretación de las lecturas, las absorbancias fueron transformadas en porcentajes de positividad (PP), considerando que el control positivo (con un 100% de PP) y uno negativo, obtenidos de muestras diagnosticadas por CIEF. La línea de corte entre positividad y negatividad (*cut off*) se consideró con un PP de 65%.
- Histopatología testicular. Se realizaron cortes semiseriados de 4 µm de espesor y se tiñeron con Hematoxilina Eosina (H-E) para la visualización general del tejido testicular y con Ácido Peryódico de Schiff (PAS), para teñir las membranas basales, especialmente a nivel tubular (Borie *et al.*, 2002). Las muestras fueron consideradas positivas cuando se detectó alteración en la membrana basal (engrosamiento o discontinuidad), degeneración tubular e inflamación (Borie *et al.*, 2002).

Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva, considerando para esto la frecuencia de presentación como porcentajes. Los datos obtenidos, fueron tabulados y representados en gráficos, en el programa Microsoft Office 2020. Los datos fueron resumidos en una tabla de contingencia de 2x2, con la que se realizó un análisis de concordancia (*Kappa*: <0 sin acuerdo; <0.20 acuerdo leve; 0.21-0.40 acuerdo justo; 0.41-0.60 acuerdo moderado; 0.61-0.80 acuerdo sustancial; 0.81-1.00 acuerdo casi perfecto).

RESULTADOS

El 6.6% (2/30) de los animales muestreados fueron clasificados como positivos considerando el resultado positivo de al menos dos pruebas serológicas. En específico, tanto los signos clínicos como las técnicas de ICT, ELISA comercial y ELISA-indirecto presentaron 6.6% (2/30) de positividad, mientras que con CIEF fue de 23.3% (7/30) y mediante histopatología de 60% (18/30) (Figura 1).

En los análisis histopatológicos se evidenció que 29 canes (96.6%) presentaron degeneración tubular, 28 (93.3%) presentaron membranas basales discontinuas, 20 (66.6%) inflamación y membranas basales engrosada, 7 (23.3%) necrosis, 4 (13.3%) con presencia de eritrocitos en el lumen y en uno (3.3%) hubo presencia de hemosiderófagos (Figura 2).

En el análisis de concordancia solo se observaron relaciones pobres, leves, justas y moderadas entre técnicas; sin embargo, se destaca que todos los caninos positivos a CIEF también fueron detectados como positivos a la histopatología y solo 3% (1/30) de los caninos seropositivos fue, además, positivo a histopatología y signología clínica (Cuadro 1). La mejor concordancia entre técnicas correspondió a ICT con ELISA comercial (0.464; IC -0.165 a 1.000).

DISCUSIÓN

La signología clínica de la brucelosis es variada, incluso muchas veces compleja de identificar; sin embargo, en machos hay signos clínicos más evidentes como epididimitis unilateral o bilateral, aumento o atrofia testicular e inflamación de próstata, entre otros menos evidentes como linfadenopatía

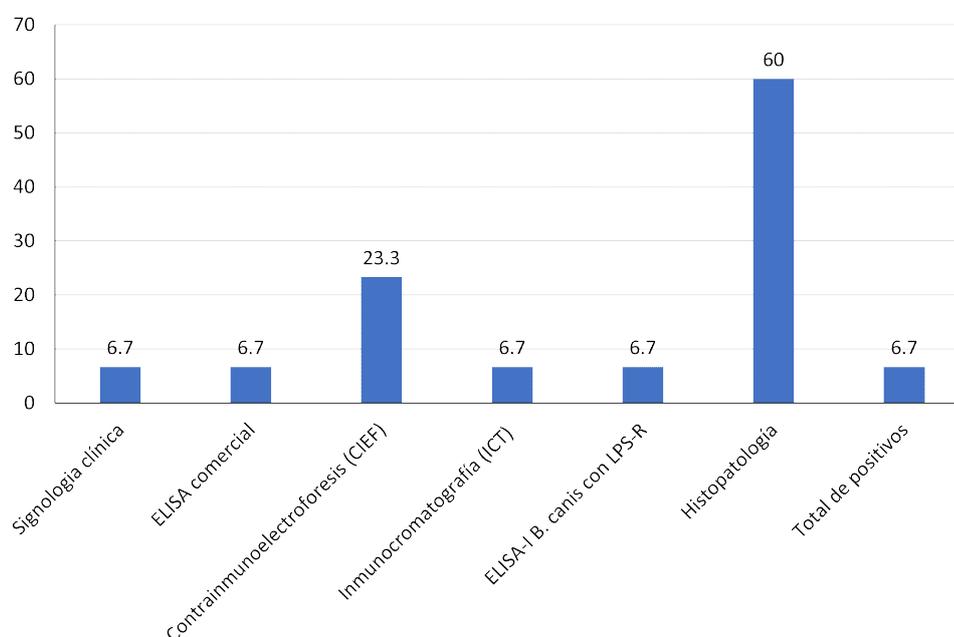


Figura 1. Frecuencia porcentual de caninos vagabundos positivos a brucelosis canina de un sector de la ciudad de Talca, Chile, según el criterio diagnóstico utilizado

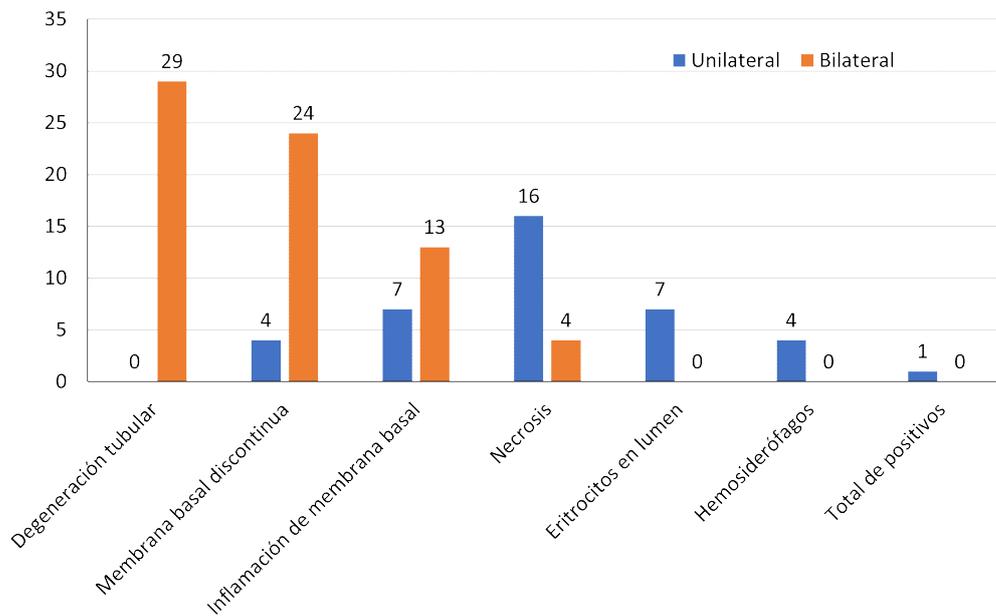


Figura 2. Lesiones histopatológicas encontradas a nivel testicular en caninos vagabundos positivos a brucelosis canina de un sector de la ciudad de Talca, Chile

periférica, discoespondilitis y esterilidad (Boeri *et al.*, 2008). En una investigación realizada en Buenos Aires, Argentina, solo 4 de 16 perros seropositivos presentaron signología clínica asociada, resultados mayores a los de la presente investigación; sin embargo, sin diferencia estadística entre grupos, indicando que la signología clínica no se encuentra presente en todos los caninos expuestos a la enfermedad (Boeri *et al.*, 2008).

La diferencia entre técnicas serológicas podría estar dada por sus sensibilidades y especificidades, por las reacciones cruzadas con otros microorganismos, y por la propia formación de antígenos y naturaleza intermitente a la bacteriemia. Asimismo, cualquier resultado positivo serológico debe ser corroborado con otra técnica (Camargo-Castañeda *et al.*, 2021). En particular, en Chile se recomienda la antibioticoterapia junto con castración/esterilización e incluso la eutanasia en caninos sin tutores responsables (Weinborn, 2017). Sin embargo, el tratamiento con

antibióticos y cirugía no excluye la posibilidad del que el animal sea una fuente de infección para las personas y otros animales, debido a que la bacteria se aloja en tejido genitourinario y en células del sistema reticuloendotelial (Carmichael y Shin, 1996). Asimismo, la presencia de anticuerpos en sangre se puede presentar en diferentes intervalos de tiempo dependiendo del método diagnóstico, volviéndose un microorganismo difícil de detectar por métodos serológicos, incluso hasta 12 semanas pos-infección (Borie *et al.*, 2002; Camargo-Castañeda *et al.*, 2021).

En cuanto a las muestras de laboratorio, la CIEF es una prueba de laboratorio de referencia en Chile para el diagnóstico de la brucelosis canina con especificidad y sensibilidad sobre el 96% (Sánchez, 2007). Gómez (2007) muestreó a 363 perros de clínicas veterinarias de la Región Metropolitana, encontrando 16.8% de seropositividad, siendo menor a la seropositividad obtenida en este tra-

Cuadro 1. Análisis de concordancia (*Kappa*) entre técnicas y procedimiento utilizados para el diagnóstico de brucelosis canina en caninos vagabundos en un sector de la ciudad de Talca, Chile

Técnica	Técnica	Resultado	Concordancia
ELISA indirecto	Histopatología	-0.136 (95% CI=-0.332 a 0.049)	Sin acuerdo
Clínica	ICT	-0.071 (95% CI=-0.141 a -0.002)	Sin acuerdo
Clínica	ICT	-0.071 (95% CI=-0.141 a -0.002)	Sin acuerdo
ELISA indirecto	ICT	-0.071 (95% CI=-0.141 a -0.002)	Sin acuerdo
Clínica	Histopatología	-0.023 (95% CI=-0.178 a 0.132)	Sin acuerdo
ICT	Histopatología	0.091 (95% CI=-0.036 a 0.218).	Leve
Clínica	CIEF	0.132 (95% CI=-0.221 a 0.485)	Leve
CIEF	Histopatología	0.337 (95% IC entre-0.104 a 0.571)	Justo
ICT	CIEF	0.380 (95% IC entre -0.009 a -0.769)	Justo
ELISA comercial	ICT	0.464 (95% IC entre -0.165 a 1.000)	Moderado
ELISA comercial	ELISA indirecto	0.071 (95% IC entre -0.141 a -0.002)	Justo
ELISA comercial	CIEF	0.132 (95% IC entre -0.221 a 0.485)	Leve
ELISA comercial	Histopatología	0.023 (95% IC entre -0.178 a 0.132)	Leve
CIEF	ELISA indirecto	0.071 (95% IC entre -0.141 a -0.002)	Justo

CIEF: Contraimmunoelectroforesis, ICT: inmunocromatografía

bajo (23.3%), lo cual podría explicarse por el tipo de animal (caninos vagabundos) de este estudio. También está documentado que CIEF podría reaccionar de forma cruzada con bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus* spp, *Bordetella bronchiseptica*, y *Actinobacillus* spp, entre otras, resultando en falsos positivos (Carmichael y Shin, 1996; Weinborn, 2017), lo cual podría estar ocurriendo en la presente investigación.

Tuermers *et al.*, (2013) reportaron 1% de prevalencia de brucelosis canina en 400 muestras de perros vagabundos en la ciudad de Temuco, utilizando la misma técnica de ICT del presente trabajo. La concordancia pobre entre ICT y CIEF podría estar dada por la cantidad de antígenos presentes en el suero para que una muestra reaccione positiva, donde la técnica ICT requiere una mayor cantidad de anticuerpos para reaccionar positivo, a pesar de una similar sensibilidad y especificidad de estas técnicas (Tuermers *et al.*, 2011). Asimismo, Wanke *et al.* (2002)

compararon la prueba de ICT con las técnicas de 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y ELISA, determinando una sensibilidad y especificidad de 89 y 100%, respectivamente para la ICT en los casos agudos y subagudos, mientras que, estos valores fueron menores a los obtenidos por el ELISA en casos de brucelosis crónica. Ante esto, es posible que los caninos del presente estudio puedan tratarse de casos crónicos y, por ende, presentar falsos negativos (Palacios *et al.*, 2021); sin embargo, para determinar la fase de la infección en la presente investigación se requieren estudios adicionales.

Por otra parte, Meza (2011) desarrolló una prueba ELISA-I para el diagnóstico de la enfermedad, en el cual utilizó un extracto altamente purificado de lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de *B. abortus* CRB51, el cual presenta una sensibilidad de 97.5% y especificidad de 97.3% y, si bien, esta prueba tuvo un alto índice de concordancia con CIEF

(Meza *et al.*, 2013), en el presente estudio no se presenta ese mismo comportamiento, probablemente por el tamaño de la población estudiada.

Los niveles de lesiones histopatológicas encontradas a nivel testicular coinciden con el único estudio efectuado en Chile, donde los tres caninos con lesiones histopatológicas fueron positivos a la prueba serológica CIEF (Borie *et al.*, 2002), mientras que, en el presente estudio solo un animal presentó todas las lesiones y fue positivo a CIEF. La lesión más común en casos de brucelosis canina es la degeneración testicular (Volkweis *et al.*, 2020), coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, el factor cronicidad puede afectar el tipo de afectación histopatológica (Anderson y Binnington, 1983; Camargo-Castañeda *et al.*, 2021).

Otro factor que se debe considerar es el uso de formalina como herramienta de conservación de tejidos para el diagnóstico clínico, siendo una de sus principales desventajas la degradación de las proteínas, que podría influir en el resultado final (Shi *et al.*, 1991). Asimismo, se debe considerar el tiempo de fijación de la muestra, el tipo de fijador, y la temperatura de almacenamiento, así como los protocolos para la detección de proteínas y extracción (Paavilainen *et al.*, 2010). Por último, esta no es una técnica específica para diagnóstico de brucelosis canina, puesto que las lesiones encontradas pueden ser producidas por diferentes etiologías, desde traumáticas hasta infecciosas por otros patógenos.

Uno de los problemas actuales que se tiene en la ciudad de Talca y, en Chile en general, es la alta presencia de perros vagabundos (3,461,104 caninos sin sostenedores), a los que se les puede sumar el 20% de los caninos con tutor que se les permite salir a la calle sin supervisión (8,306,650 de caninos con sostenedor) (SUBDERE, 2022) y que podrían contagiarse de brucelosis o transmitirla al humano.

CONCLUSIONES

- Existen caninos que deambulan libremente por la ciudad de Talca-Chile, con diferentes resultados frente a técnicas serológicas o de laboratorio para brucelosis canina.
- La concordancia entre técnicas diagnósticas varió entre sin acuerdo (pobre), leve, justo y moderado, por lo que, se debe realizar más de una técnica diagnóstica, no recomendándose aquellas combinaciones con concordancia pobre o leve.
- Se recomienda el uso combinado de la prueba de inmunocromatografía (ICT) con ELISA comercial.
- No se recomienda la histopatología como única técnica diagnóstica.

LITERATURA CITADA

1. **Anderson GI, Binnington AG. 1983.** Discospondylitis and orchitis associated with high *Brucella* titre in a dog. *Can Vet J* 24: 249-522.
2. **Ardoino SM, Baruta DA, Toso RE. 2006.** Brucelosis canina. *Cienc Vet* 8: 50-61.
3. **Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. 2017.** Ley 21.020 17-20.
4. **Biogal Galed Laboratories Acs Ltd, 2018.** Canine *Brucella* antibody test kit. [Internet]. Disponible en: <https://www.biogal.com/wp-content/uploads/2021/08/63CBR311-mini-211020.pdf>
5. **Bionote, 2016.** Prueba rápida Anigen C. *Brucella* Ab. [Internet]. Disponible en: <https://www.bionote.com.mx/img/cms/Rapid%20C-Brucella%20Ab%20-Espan%CC%83ol%202019%20.pdf>
6. **Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa-Estani S, Lucero NE. 2008.** Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 68: 291-297.

7. **Borie C, Alvarado N, Escobar B, Martínez V, Martínez E, Dettleff P, Galarce N. 2019a.** *Brucella canis* en perros con dueño de la región metropolitana de Chile: detección por cultivo y serología. En: Memorias VIII Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba.
8. **Borie C, Alvarado N, Martínez E, Escobar B, Dettleff P, Martínez V, Galarce N. 2018.** *Brucella canis*: ¿Un riesgo zoonótico en centros de rescate caninos en Chile?, En: XLI Reunión Anual de la Sociedad de Microbiología de Chile. Puerto Varas, Chile.
9. **Borie C, Cepeda R, Villarroel M, De los Reyes M. 2002.** Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. Arch Med Vet 34: 111-116. doi: 10.4067/S0301-732X2002000100012
10. **Camargo-Castañeda AM, Stranahan LW, Edwards JF, Garcia-Gonzalez DG, Roa L, Avila-Granados LM, Hensel ME, et al. 2021.** Characterization of epididymal and testicular histologic lesions and use of immunohistochemistry and PCR on formalin-fixed tissues to detect *Brucella canis* in male dogs. J Vet Diagn Invest 33: 352-356. doi: 10.1177/1040638720986883
11. **Carmichael LE, Shin SJ. 1996.** Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. Semin Vet Med Surg 11: 161-165. doi: 10.1016/s1096-2867(96)80028-4
12. **Castillo V, Cotrino V, Moreno C. 2002.** Encuesta serológica sobre *Brucella canis* en pacientes atendidos en la clínica de pequeños animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Arch Med Vet 13: 22-25.
13. **Celis. F. 2013.** Comparación entre dos técnicas serológicas para el diagnóstico de brucelosis canina en perros vagos de la ciudad de Talca. Tesis de Médico Veterinario. Talca, Chile: Univ. Santo Tomas. 59 p.
14. **Chinyoka S, Dhliwayo S, Marabini L, Dutlow K, Matope G, Pfukenyi DM. 2014.** Serological survey of *Brucella canis* in dogs in urban Harare and selected rural communities in Zimbabwe. J S Afr Vet Assoc 85: 1-5. doi: 10.4102/jsava.v85i1.1087
15. **Galanos C, Luderitz O, Westphal O. 1969.** A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. Eur J Biochem 9: 245-249. doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x
16. **Galarce N, Escobar B, Martínez E, Alvarado N, Peralta G, Dettleff P, Dorner J, et al. 2020.** Prevalence and genomic characterization of *Brucella canis* strains isolated from kennels, household, and stray dogs in Chile. Animals (Basel) 10: 2073. doi: 10.3390/ani10112073
17. **Gómez V. 2007.** Seroprevalencia de brucelosis canina por *B. canis* en clínicas veterinarias del Gran Santiago 2002-2003. Tesis de Médico Veterinario. Santiago, Chile: Univ. de Chile. 47 p.
18. **Ji-Youl Jung, Soon-Seek Yoon, Seunghee Lee, Jung-Won Park, JinJu Lee, Moon Her, ByungJae Sol, Jae-Hoon Kim. 2020.** Pathological, immunohistochemical, and bacteriological findings in dogs infected with *Brucella canis*. Korean J Vet Res 60: 9-14. doi:10.14405/kjvr.2020.60.1.9
19. **Meza MI, Retamal P, Borie C, Abalos P. 2012.** Desarrollo de una prueba de ELISA para el diagnóstico de infección por *Brucella canis* en perros. Av Cienc Vet 27: 40. doi:10.5354/0716-260x.2012.-25986
20. **Meza M. 2011.** Desarrollo de un ELISA Indirecto con antígeno LPS-R de *Brucella abortus* cepa RB51, para el diagnóstico serológico de brucelosis canina. Tesis de Médico Veterinario. Santiago, Chile: Univ de Chile. 19 p.
21. **Nelson R, Couto G. 2019.** Small animal internal medicine. 5th ed Elsevier. 1509 p.

22. **Olivera M, Giraldo CA, Lorenzo CD. 2011.** PCR identification of *Brucella canis* in canine blood and milk. A case report. *Arch Med Vet* 43: 295-298. doi: 10.4067/S0301-732X2011000300012
23. **Paavilainen L, Edvinsson Å, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, Wester K. 2010.** The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem Cytochem* 58: 237-246. doi: 10.1369/jhc.2009.954321
24. **Palacios V, Arellano B, Benítez A, Molares A, Suárez F, 2021.** Desarrollo y validación de dos inmunoensayos para la detección de *Brucella canis* en perros. *Abanico Vet* 11: 1-13.
25. **Pardo A, Pérez C, Góngora A, Gómez L, Moreno A. 2009.** Exploratory survey of *Brucella suis* infection in dogs from Villavicencio-Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 14: 1690-6. doi: 10.21897/rmvz.352
26. **Sánchez A. 2007.** Brucelosis canina y sus implicancias reproductivas – VetPraxis. [Internet]. Disponible en: <https://www.vetpraxis.net/2009/05/21/brucelosis-canina-y-sus-implicancias-reproductivas/>
27. **Sánchez F. 2017.** Seroprevalencia de brucelosis canina en perros con dueño del Gran Santiago y factores de riesgo asociados a su presentación. Tesis de Magister. Santiago, Chile: Univ. de Chile., 51 p.
28. **Shi SR, Key ME, Kalra KL. 1991.** Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748. doi: 10.1177/39.6.1709656
29. **SUBDERE, 2022.** Estimación de la población canina y felina del país y diagnóstico de la tenencia responsable. Santiago de Chile: Subsecretaría de Desarrollo Regional y Administrativo. 18 p.
30. **Troncoso I, Rojas R, Fischer C, Núñez C, Arrué K. 2013.** Brucelosis en criaderos caninos: seroprevalencia de 33 casos. *Hosp Vet* 5: 50-55.
31. **Tuermanns C, Lüders C, Rojas C, Serri M, Castillo C, Espinoza R. 2013.** Detección de *Brucella canis* por método de inmunocromatografía en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, Chile, 2011. *Rev Chil Infectol* 30: 395-401. doi: 10.4067/S0716-101820130-004-00007
32. **Volkweis FS, Blume H, Júnior HL, Lazzari AM, Mulinari F. 2019-** Avaliação espermática e histológica dos testículos e epidídimos de caninos naturalmente infectados por *B. canis*. *Pubvet* 14: 141. doi: 10.31533/pubvet.v14n4a-543.1-4
33. **Wanke MM, Delpino MV, Baldi PC. 2002.** Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol* 88: 367-375. doi: 10.1016/s0378-1135(02)-00152-9
34. **Weinborn R. 2017.** Brucelosis. In: Troncoso I (ed). *Enfermedades zoonóticas en la clínica de animales de compañía*. Santiago, Chile: RIL editores. p 157-183.