

โรค布鲁เซลโลซิสในสุนัข : การตรวจด้วยวิธี แรปปิดสไลด์แอกกลูตินเนชั่น และการเพาะแยกเชื้อ Canine Brucellosis : The 2-Mercaptoethanol-Rapid Slide Agglutination Test and Bacteriological Detection

สุวัฒน์ เกียรติเสวี¹ พรรณจิตต์ นิลกำแหง¹ ธวัชชัย สักดีภู่อารัม¹ ทิพย์พร ชีรลีกุล² และ มนชนก วิจารณ์สรณ์³
Suwat Kiatisewee, Parnchitt Nilkumhang, Thavajchai Sakpuaram,
Tippayaporn Theeraleekul, and Monchanok Vijarnsorn

ABSTRACT

A total of 178 adult dogs of various breeds, 67 males and 111 females were examined for *Brucella canis* infection by 2- Mercaptoethanol-Rapid Slide Agglutination test and blood and/or organ cultures. Three dogs (1.68 %) were found positive to the test, however, the bacterial culture was not done. Bacterial culture was attempted in 6 dogs with history of reproductive failure but negative to 2-ME-RSAT, no *Brucella canis* organism was detected.

Considering the accuracy and sensitivity of the 2-ME-RSAT and the inconclusive figures of previous reports, *Brucella canis* infection was assumably not responsible for the economic loss due to breeding failure.

Key words: Canine Brucellosis, *Brucella canis*, RSAT, 2-ME-RSAT

1 ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

2 โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

3 ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

บทคัดย่อ

ในการสำรวจความชุกของโรค布鲁เซลโลซิสที่เกิดจากเชื้อ *Brucella canis* สุนัขพันธุ์ต่างๆ จำนวน 178 ราย เพศผู้ 67 ราย เพศเมีย 111 ราย ได้รับการตรวจหาแอนติบอดี แอ็กกลูตินิน โดยวิธี 2-Mercaptoethanol-Rapid Slide Agglutination และการเพาะแยกเชื้อจากเลือดและอวัยวะผลปรากฏว่าสุนัข 3 ราย (1.68%) เป็นเพศผู้ 2 ราย เพศเมีย 1 รายให้ผลบวกต่อการตรวจโดยวิธี 2-ME-RSAT แต่สุนัขที่ให้ผลบวกทั้ง 3 รายนี้ไม่ได้ทำการเพาะแยกเชื้อ ไม่พบเชื้อ *B.canis* ในสุนัขที่ให้ผลลบอีก 6 รายที่มีประวัติการผสมไม่ติดและปัญหาของโรคระบบสืบพันธุ์อื่นๆ

จากความจำเพาะและแม่นยำสูงของวิธีการทดสอบ 2-ME-RSAT ทำให้สรุปได้ว่า โรค布鲁เซลโลซิสที่เกิดจากเชื้อ *B.canis* ไม่ใช่ปัญหาใหญ่ที่ทำให้เกิดความล้มเหลวในการผสมพันธุ์ในวงการเพาะพันธุ์สุนัขเพื่อการค้า

คำนำ

โรค布鲁เซลโลซิสในสุนัขเป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Brucella canis* ทำให้เกิดความล้มเหลว ในระบบสืบพันธุ์ เช่น ผสมไม่ติดหรือทำให้เกิดการแท้งลูกในสุนัขเพศเมีย และอวัยวะเพศผู้ส่วน เอพิไดมิสอักเสบ ความสำคัญของโรคนี้นี้อยู่แค่การสูญเสียทางเศรษฐกิจของธุรกิจการเพาะพันธุ์สุนัข แต่อยู่ที่คนสามารถติดเชื้อนี้ได้ด้วย โดยเฉพาะเจ้าของสุนัข พนักงานห้องทดลอง ผู้ดูแลสัตว์เลี้ยงและสัตวแพทย์

ในสภาพธรรมชาติการติดต่อของโรค布鲁เซลโลซิสเกิดได้หลายทาง เช่นติดต่อกันทางการสืบพันธุ์ระหว่างสุนัขเพศเมียและเพศผู้ ติดต่อกันทางเยื่อเมือก ติดต่อกันทางการกิน ติดต่อกันทาง

เครื่องมือเครื่องใช้ และ อุปกรณ์การตรวจรักษา และติดต่อกันไปยังลูกในท้องก่อนคลอดทางรกและน้ำคร่ำ

โรค布鲁เซลโลซิสในสุนัขเป็นโรคที่ไม่มีอาการแสดงให้เห็นชัดเจนในทางคลินิก การวินิจฉัยโรคค่อนข้างยาก การตรวจแบบกลั่นกรองเบื้องต้น ใช้วิธีทางซีรั่มวิทยาเพื่อยืนยันการติดเชื้อแน่นอน ใช้วิธีเพาะแยกเชื้อ *Brucella canis* จากเลือด เนื้อเยื่อ น้ำสุหรือน้ำหล่อเลี้ยง

Rapid slide agglutination test (RSAT) เป็นการตรวจทางซีรั่มวิทยาแบบกลั่นกรองเบื้องต้น ข้อดีคือ ทำได้รวดเร็ว ประหยัด และสามารถตรวจพบหลังการติดเชื้อเพียง 1-2 สัปดาห์ มีความถูกต้องเมื่อให้ผลการตรวจเป็นลบ ตรงกันข้ามโอกาสพบผลบวกเทียม (false positive) มีได้สูงถึง 65% (Greene and George,1984) การเกิดผลบวกเทียมเนื่องมาจากแอนติเจนผิว (surface antigens) ของ *B.canis* ที่ใช้ในการตรวจสามารถเกิด cross-reactions กับ แอนติบอดีของแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas* และ *Moraxella-like organism* (Greene and George,1984)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจโดยอาศัยหลักการของ RSAT ให้มีความแม่นยำเพิ่มขึ้น โดยใช้ 2-Mercaptoethanol เป็นตัวจัด heterogenous IgM ที่ทำให้เกิดผลบวกเทียม การตรวจวิธีนี้เรียกว่า 2-Mercaptoethanol-Rapid Slide Agglutination Test (2-ME-RSAT) ซึ่งมีชุดการตรวจสำเร็จรูปคือ D-Tec CB

การทดสอบด้วย 2-ME-RSAT จะให้ผลบวกต่อการตรวจหลังจากติดเชื้อ 1-4 สัปดาห์ไปแล้ว

รายงานต่อไปนี้เป็นการศึกษาการติดเชื้อ *B.canis* ในสุนัข โดยวิธีทางซีรั่มวิทยา คือ 2-ME-RSAT และการเพาะแยกเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

สุนัขตัวอย่าง จำนวนสุนัขที่ทำการสำรวจ 178 ราย เป็นสุนัขเพศผู้ 67 ราย เพศเมีย 111 ราย ทุกสาย เป็นสุนัขที่โตเต็มวัยที่ผ่านการผสมพันธุ์ หรือมีลูกมาแล้วทั้งหมด ระหว่าง เดือน ธันวาคม 2537 ถึง เดือน ธันวาคม 2538 สุนัขที่ทำการสำรวจมีหลายพันธุ์ด้วยกันทั้งพันธุ์ ผสม และพันธุ์แท้ คือ สุนัขพันธุ์ไทย สุนัขพันธุ์บ็อกเซอร์ สุนัขพันธุ์โดเบอร์แมน สุนัขพันธุ์พินเชอร์ สุนัขพันธุ์เยอรมันเชพเพิร์ด สุนัขพันธุ์พูเคิล สุนัขพันธุ์เซ็ทแลนด์ สุนัขพันธุ์ปักกิ่ง สุนัขพันธุ์บูลด็อก สุนัขพันธุ์ชิวาว่า สุนัขพันธุ์บาสเซ็ทฮาวนด์ สุนัขพันธุ์เซา-เซา สุนัขพันธุ์ ค็อกเกอร์สเปเนียล สุนัขพันธุ์เกรทเดน สุนัขพันธุ์ลาบราดอร์ สุนัขพันธุ์มินิเจอร์ พินเชอร์ สุนัขพันธุ์ปอมเมอเรเนียน สุนัข

พันธุ์ร็อตไวเลอร์ สุนัขพันธุ์สปิทซ์ สุนัขพันธุ์เชนด็เบอนาร์ดี สุนัขพันธุ์เทอร์เรีย และสุนัขพันธุ์ยอร์กชายเทอร์เรีย วันที่เก็บตัวอย่างเลือดสุนัข สุนัขจำนวนหนึ่ง เป็นสุนัขที่มีปัญหาของระบบสืบพันธุ์ (แท้งลูก ผสมไม่ติด) สุนัขจำนวนที่สองซึ่งมีจำนวน มากของสุนัขตัวอย่าง ซึ่งแสดงอาการป่วยของโรคที่ไม่เฉพาะเจาะจง สุนัขจำนวนที่สามจะเป็นสุนัข มีอาการปกติ ตัวอย่างเลือดที่ได้นำมาแยกเอาซีรัม ออกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนถึงวันที่ ทำการทดสอบทางซีรัมวิทยา

การทดสอบทางซีรัมวิทยา

ใช้การตรวจ rapid slide agglutination โดยชุดทดสอบ canine brucellosis antibody test kit D-Tec CB ผลิตโดยบริษัท พิตแมน มัวร์ สหรัฐอเมริกา จด

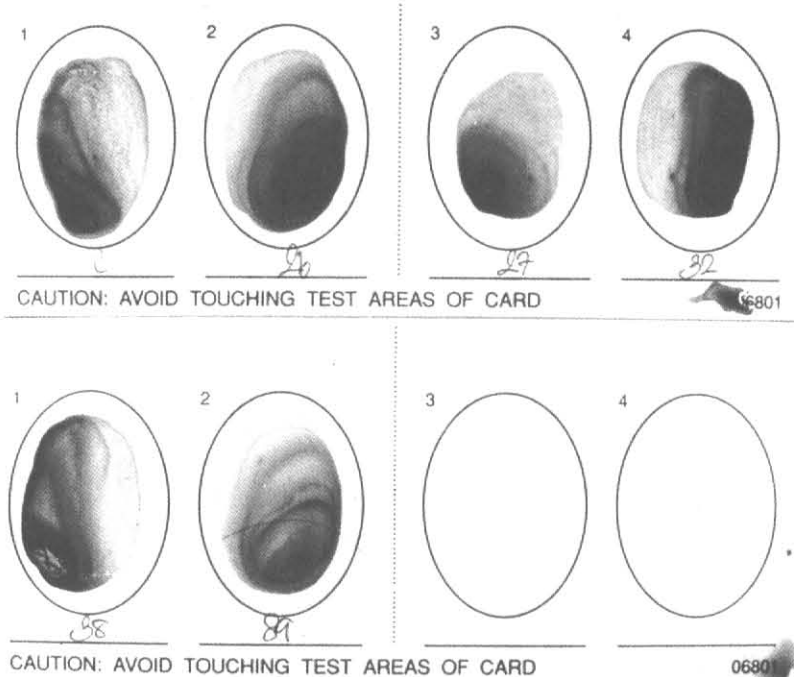


Figure 1 Step 1 agglutination between control (C, upper left) and serum samples. Positive samples, no 26,27,89, were shown.

ทะเบียน U.S.Veterinary License NO. 298

ขั้นตอนของการทดสอบ ขั้นแรกเป็น RSAT หยดซีรัมและแอนติเจน (rose bengal stained *Brucella ovis* agglutination antigen) (Medveczky and Crichton, 1986) อย่างละ 1 หยด (0.03 มล.) ลงบนกระดาดแข็งที่เตรียมไว้ คนให้เข้ากัน เปรียบเทียบการเกิด agglutination กับซีรัมควบคุม (control) (Figure 1)

ในกรณีที่ซีรัมตัวอย่างมีแอนติบอดีต่อ *B.canis* จะเกิดปฏิกิริยา agglutination ภายใน 2 นาที เฉพาะ ซีรัมตัวอย่างที่ให้ผลบวกเท่านั้นที่ทำการทดสอบต่อ ในขั้นที่สอง คือ 2-ME-RSAT หยดสารละลาย 0.2 M. 2-Mercaptoethanol 2 หยด (0.06 มล.) ลงในซีรัมตัวอย่างจำนวน เท่ากัน ผสมโดยการเขย่าให้เข้ากันดี จากนั้นหยดสารผสม 1 หยดลงบนกระดาดแข็ง และ แอนติเจน 1 หยด คนให้เข้ากัน สังเกตปฏิกิริยา ภายใน

2 นาที ซีรัมที่ซีรัมให้ผลบวกต่อ การทดสอบ 2-ME-RSAT ถือว่าเป็นซีรัมที่ติดเชื้อ *B.canis* (Figure 2)

ซีรัมที่ซีรัมให้ผลบวกต่อการทดสอบ RSAT แต่ให้ผลลบต่อการทดสอบ 2-ME-RSAT พิจารณาว่า ซีรัมอาจอยู่ในระยะต้นของการติดเชื้อ *B.canis* หรือมี non-specific agglutinins ต่อ *B.canis* ซึ่งจะตรวจซ้ำ ในอีก 1 เดือนต่อมา

การเพาะแยกเชื้อ ตัวอย่างที่ทำการเพาะแยกเชื้อคือ เลือด สังกัดหลังภายในมดลูก ของสุนัขเพศเมีย กระเพาะอาหาร ม้าม และปอดของลูกสุนัขที่แท้ง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ enrichment broth ได้แก่ tryptose broth และ อาหารแข็ง คือ serum-Trypticase-soy agar serum ที่ใช้คือ 5% bovine serum ยาปฏิชีวนะที่ใช้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ polymyxin B. ซึ่งออกฤทธิ์ได้ กว้างสำหรับแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ ทำการรอบเพาะที่

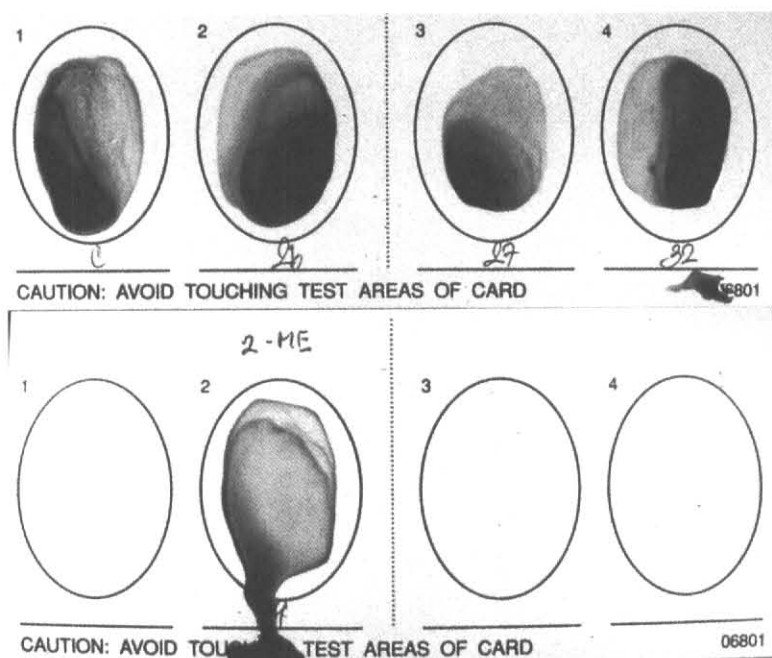


Figure 2 Positive serums from step 1 were retested by 2-ME-RSAT for agglutination. Control (C, upper left), positive sample (no. 89) and negative samples (no.26,27) were shown.

37°C โดยไม่ใช้ CO₂**ผล****ความชุกของโรค (Prevalence of infection)**

จากสุนัข 178 ราย ตรวจพบแอนติบอดี agglutinin ต่อ *B.canis* ในสุนัข 3 ราย หรือ 1.68% ช่วงความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 0.7 ถึง 2.5% เป็นสุนัขเพศผู้ 2 ราย เพศเมีย 1 ราย ดัง Table ที่ 1 และลักษณะทางคลินิกของสุนัข 3 รายที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบปรากฏใน Table 2

ผลการเพาะแยกเชื้อ

สุนัข 6 ราย ที่มีประวัติการผสมไม่ติดหรือแท้งลูก แต่ตรวจไม่พบแอนติบอดี agglutinin ในเลือด หลังจากรับการผ่าตัดเอามดลูกออก เมื่อทำการเพาะแยกเชื้อจากมดลูกหรืออวัยวะของลูกที่ตาย ไม่ปรากฏว่าพบเชื้อ *B.canis*

วิจารณ์

โรค布鲁เซลล์ในสุนัขมีรายงานจากประเทศในทวีปต่างๆ ทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา อเมริกาใต้ ยุโรป เอเชีย (จีน อินเดีย ญี่ปุ่น และ ฟิลิปปินส์) ยกเว้น ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ (Medveczky and

Table 1 Number of examined dogs and number of positive dogs.

Sex	Total no	No. positive (%)
Male	111	2 (1.80%)
Female	67	1 (1.49%)
All	178	3 (1.68%)

Table 2 Clinical findings of three dogs positive for 2-ME-RSAT.

No.	Age(yr)	Sex	Breed	Presenting signs when blood were collected.	Diagnosis
1	10	M	Mixed	non febrile, dyspnea, chronic cough, scrotal dermatitis and swelling of extremities	Chronic debilitating disease
2	5	M	Miniature Pinscher	posterior abdominal pain hematuria, vomit	Acute prostatitis
3	10	F	German Shepherd	ataxia, incoordination purulent vaginal discharge	Pyometra Spondylosis (L1 -L2 vertebrae)

No = Number, yr =year, M = Male, F = Female.

Crichton, 1986.) มีรายงานการเกิดโรคในคนเนื่องจาก *B. canis* ในหลายประเทศ ทำให้โรคนี้นี้มีความสำคัญในระดับหนึ่งของโรคสัตว์สู่คน แต่โดยทั่วไป "คน" ติดเชื้อ *B. canis* ได้ยากกว่าติดเชื้อมนุษย์ตัวอื่นๆ (Greene and George, 1984.)

ในประเทศไทย พรหมจิตต์ และคณะ (2529) ได้ทำการสำรวจสุนัขในเขตกรุงเทพมหานคร โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่าง MPAT (Microplate Agglutination Test) และ STAT (Standard Tube Agglutination Test) พบว่าสุนัขมี ไตเตอร์ agglutination ตั้งแต่ 50 หน่วยสากลขึ้นไป 63-64% โดยวิธี MPAT และจำนวน 41.22% ด้วยวิธี STAT และในการศึกษาต่อมาเมื่อใช้ 2-ME-TAT เป็นวิธีทดสอบ ร่วมกับการเพาะแยกเชื้อเฉพาะรายที่ให้ผลบวกต่อ 2-ME-TAT ไม่ปรากฏว่าพบเชื้อ *B. canis*

จากความไม่สอดคล้องของผลและวิธีการในการสำรวจ ทำให้ไม่อาจสรุปสถานการณ์ของโรคนี้ในกลุ่มสุนัขเลี้ยงในกรุงเทพมหานครได้

Badakhsh *et al.* (1982) ได้ปรับปรุงวิธีทดสอบ *B. canis* มาเป็น RSAT และ 2-ME-TAT ทั้งนี้เพื่อลดการพบผลบวกเทียมที่เกิดจาก non specific agglutinins ต่อมา Pue *et al.* (1986) เปรียบเทียบการทดสอบ RSAT, 2-ME-TAT และ AGID (Agar Gel Immunodiffusion Test) และ Nicoletti and Chase (1987b) ประเมินผลการตรวจด้วย RSAT, TAT, AGID และการเพาะแยกเชื้อพบว่า ในการติดเชื้อระยะ 12 สัปดาห์แรก วิธีการทดสอบทางซีรัมวิทยาทั้ง 3 วิธีไม่มีวิธีใดที่ให้ผลแน่นอนเท่ากับการเพาะเชื้อจากเลือด อย่างไรก็ตามกรณีที่มีการติดเชื้ออย่างเรื้อรังอาจไม่พบเชื้อในเลือด (non-bacteremia) บางช่วง (Carmichael and Greene, 1990) และสรุปได้ว่า 2-ME-RSAT เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจเบื้องต้น โดยเฉพาะในคลินิกโรคสัตว์ที่ไม่มีห้องปฏิบัติการ เนื่องจากทำได้ง่าย และมีความไวสูง ในกรณีที่ให้ผลลบ พบว่า

99% แสดงว่า ไม่มีการติดเชื้อนี้ ซึ่งตรงกับคำแนะนำของ Carmichael and George (1990)

ฉะนั้นในการศึกษารังนี้คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ 2-ME-RSAT เป็นวิธีการตรวจหา ความชุกของโรค ผลจากการสำรวจพบว่าความชุกของโรคติดเชื้อ *B. canis* เป็น $1.68 \pm 0.93\%$ ซึ่งใกล้เคียงกับการสำรวจของ Saegusa *et al.* (1978) ที่พบความชุกของโรค 2.9% ในสุนัขบริเวณกรุงโตเกียวทั้งสุนัขเลี้ยงและสุนัขจรจัด โดยใช้วิธีการตรวจทางซีรัมวิทยาวิธีเดียวกัน

สุนัขทั้ง 3 รายที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ ไม่ได้นำเลือดไปเพาะเชื้อ เนื่องจากทุกรายได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อนที่จะทราบผลการตรวจพบแอนติบอดีต่อ *B. canis* ทั้งนี้การให้ยาปฏิชีวนะทำให้ภาวะ bacteremia เนื่องจากการติดเชื้อ *B. canis* หายไปและทำให้ไม่พบ *B. canis* จากการเพาะเชื้อจากเลือด ถึงแม้ว่าเชื้อ *B. canis* ยังพบได้จากอวัยวะบางแห่ง (Carmichael and Greene, 1990) โดยเฉพาะสุนัขรายที่ 1 ซึ่งอาการป่วยทางคลินิกไม่เฉพาะเจาะจงโรคของอวัยวะระบบสืบพันธุ์ และเป็นสุนัขชราอายุมาก หากเมื่อซักประวัติย้อนหลัง เป็นสุนัขที่เคยมีปัญหาผิวหนัง งูงุ้มลูกอั้นทะอักษะ (scrotal sac dermatitis) และ ลูกอั้นทะอักษะ (orchitis) มาก่อน คาดว่าการอักษะเป็นผลจาก immune response และ ปฏิกิริยา delay type hypersensitivity ต่อตัวเชื้อ อสุจิที่หลุดลอดออกมาจากการเกิดอักษะของ เอปพิไดมัส และลูกอั้นทะอักษะ (Carmichael and Greene, 1990.)

สุนัขรายที่ 2 ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคต่อมลูกหมากอักษะเฉียบพลัน (acute prostatitis) ก็เช่นเดียวกันที่ได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เตตราไซคลิก (Nicoletti and Chase, 1987a)

สุนัขรายที่ 3 เป็นสุนัขเพศเมียที่อายุมาก เข้าใจว่า การติดเชื้อเป็นแบบเรื้อรังโดยที่ *B. canis* เข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อ ทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ คอมนดลูก และ ที่ไม่ใช่อวัยวะสืบพันธุ์ คือ endarterial circulation ใน

หมอนรองกระดูกสันหลัง (intervertebral disc) ทำให้เกิด discospondylitis และ spondylosis

สุนัขขึ้นที่ให้ผลลบต่อการทดสอบแต่มีปัญหาของการผสมไม่ติด หรือ แท้งลูกที่ได้นำเอา สิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอด จากมดลูกโดยตรง หรือจากกระเพาะอาหาร และปอดของลูกอ่อนที่แท้งออกมาก็ดี ไม่ปรากฏว่าแยกเชื้อ *B.canis* ได้ อาจเป็นไปได้ว่าเพราะ *B.canis* ไม่ใช่สาเหตุของโรค

จากการสำรวจในครั้งนี้กล่าวโดยสรุปว่า โรค布鲁塞尔โลซิสที่เกิดจากเชื้อ *B.canis* ในสุนัข ไม่ใช่ปัญหาใหญ่ที่ทำให้เกิดความล้มเหลวในการผสมพันธุ์ในวงการเพาะพันธุ์สุนัขเพื่อการค้า เพียงแต่จำเป็นต้องมีความระมัดระวัง เมื่อต้องสัมผัสกับสิ่งคัดหลั่งจากสุนัขพ่อ-แม่พันธุ์ที่มีปัญหาของการผสมพันธุ์ ซึ่งจะพบในครั้งแรกๆ จนถึงครั้งที่ 2 และ 3 ของการผสม เนื่องจากการติดเชื้อ *B.canis* สัตว์จะกลับมาเป็นปกติได้ภายในระยะ 1-5 ปี โดยที่เชื้อจะอยู่ในเนื้อเยื่อได้นานหลายเดือนหรือปีหลังจากไม่พบในกระแสเลือด

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ พันเอก (พิเศษ) สุขุม สุจริต แห่งศูนย์การสุนัขทหาร กรมการสัตวทหารบก ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

พรหมจิตต์ นิลกำแหง, ธวัชชัย ศักดิ์ภู่อารัม, และ สุวัฒน์ เกียรติเสวี. 2529. การสำรวจอัตราการเป็นโรคแท้งติดต่อกันในสุนัขเขตกรุงเทพมหานคร.

วารสารโรงพยาบาลสัตว์. 2:147-150

Badakhsh, F.F., L.E. Carmichael, and J.A. Douglass. 1982. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 15: 286-289.

Carmichael, L.E. and C.E. Greene. 1990. Canine Brucellosis, pp 573-584. In C.E. Greene (ed.). Infectious Diseases of The Dog and Cat. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Greene, C.E. and L.W.George. 1984. Canine Brucellosis, pp 646-662. In C.E. Greene (ed.). Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Medveczky, N.E. and R. Crichton. 1986. The application of a serological test to screen dogs entering Australia for antibody to *Brucella canis*. Aust. Vet. J. 63 : 375-377.

Nicoletti, P.L. and A. Chase. 1987a. The use of antibiotics to control canine brucellosis. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 9: 1063-1066.

Nicoletti, P.L. and A. Chase. 1987b. An evaluation of methods to diagnose *Brucella canis* infection in dogs. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 11: 1071-1073.

Pue, H.L, J.C. Gordon, and S.B. Nielsen. 1986. Detection of antibodies against *Brucella canis* in dogs. Mod. Vet. Pract. July/August, 1986: 612-614.

Saegusa, J., K. Ueda, Y. Goto, and K. Fujiwara. 1978. A survey of *Brucella canis* Infection in dog from Tokyo area. Jap. J. Vet. Sci. 40: 75-80.