

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

BRUCELLA CANIS: DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Por

**Natalia BACIGALUPO
Virginia GOLDBERG
Pierino TAMBASCO**

TESIS presentada como uno de los requisitos
para obtener el título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
(Orientación Medicina *Veterinaria*
.....)

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2006**

059 TG
Brucella canis
Bacigalupo, Natalia



FV/27249

TESIS aprobada por:

Presidente de mesa:

Nombre completo y firma

Segundo Miembro (Tutor):

M. PLOUET M. PLOUET
Nombre completo y firma

Tercer miembro:

PEORO E. MARTINO P. Martino
Nombre completo y firma

Fecha:

DK 2006

Autores:

N. Bacigalupo
Br. Natalia Bacigalupo

Virginia Goldberg Virginia
Br. Virginia Goldberg

Pierino Tambasco P. Tambasco
Br. Pierino Tambasco

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a las siguientes personas, que de algún modo, colaboraron en la realización del presente trabajo:

En primer lugar a nuestras familias, que estuvieron con nosotros en todo momento.
Al Departamento de Ciencias Microbiológicas, Área de Bacteriología por recibirnos desde el primer día, especialmente al Dr. Julián Bermúdez y a la Dra. Matilde Piquet.
Al Dr. Pedro Martino, la Sra. Graciela Cossio y el Sr. Julio de los Santos por ayudarnos en la recolección de las muestras.
A la Dra. Mariela Silva, Gien Müller y Pablo Llerena del DILAVE.
Al Dr. Rodrigo Puentes, Jorge Silveira y la Dra. Mónica Bianchi.
A Rosina y Ruth de Biblioteca.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO I: PATOGÉNESIS SECUENCIAL DE LA BRUCELOSIS CANINA.....	Página 14
CUADRO II - ACCIDENTES GENITALES OBSERVADOS LUEGO DE LA INFECCIÓN POR B. CANISPágina 16
CUADRO III: AGENTES INFECCIOSOS RESPONSABLES DE ABORTO Y MORTALIDAD NEONATAL EN PERRAS.	Página 19
CUADRO IV: CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN POR B. CANIS.....	Página 20
CUADRO V: RESULTADOS DE ESTUDIOS SOBRE LOS TRATAMIENTOS MÉDICOS DE LA BRUCELOSIS CANINA	Página 25
CUADRO VI: RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS.....	Página 32
CUADRO VII: DATOS DE LOS 5 CANINOS QUE RESULTARON SER POSITIVOS A LAS 3 TÉCNICAS.	
Figura 1: DIFERENCIAS EN LA ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR ENTRE LAS ESPECIES R Y S	Página 8
Figura 2: PORCENTAJE DE ABORTOS EN FUNCIÓN DEL..... ESTADO DE GESTACIÓN	Página 16
Figura 3 SENSIBILIDAD A LOS DIFERENTES TEST UTILIZADOS..... PARA EL DIAGNÓSTICO DE B.CANIS	Página 24

Indice

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1. ETIOLOGÍA	5
4.1.1. <u>Problemas de taxonomía</u>	5
4.1.2. <u>Descripción de Brucella canis, cepa salvaje</u>	5
4.1.2.1. Características culturales	6
4.1.2.2. Características morfológicas	6
4.1.2.3. Características bioquímicas y metabólicas	6
4.1.2.4. Características antigénicas	6
4.1.2.5. Sobrevida y resistencia.....	9
4.1.3. <u>Propiedades biológicas de una variante M- de B. canis</u>	9
4.1.3.1. Caracteres culturales.....	9
4.1.3.2. Caracteres estructurales y antigénicos	9
4.1.3.3. Poder patógeno	10
4.2. ESPECIES SENSIBLES.....	10
4.3. FUENTES DE INFECCIÓN	11
4.4. FORMAS DE TRANSMISIÓN.....	12
4.5. PATOGENIA.....	12
4.5.1. <u>Aspectos de la inmunidad</u>	15
4.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	15
4.7. BRUCELOSIS EN EL HOMBRE.....	18
4.8. DIAGNÓSTICO.....	18
4.8.1. <u>Elementos clínico-epidemiológicos</u>	18
4.8.1.1. Sospecha.....	18
4.8.1.2. Diagnóstico diferencial.....	19
4.8.2. <u>Diagnóstico de laboratorio</u>	20
4.8.2.1. Diagnóstico directo: Bacteriología	20
4.8.2.2. Diagnóstico indirecto: Serología	21
4.9. TRATAMIENTO.....	24
4.10. CONTROL Y PREVENCIÓN.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. TÉCNICA DE RSAT (RAPID SLIDE AGGLUTINATION TEST).....	28
5.2. TÉCNICA DE 2ME-RSAT (2 MERCAPTOETANOL RSAT)	28
5.3. TÉCNICA DE IDGA (INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR)	29
6. RESULTADOS.....	32
7. DISCUSIÓN.....	34
8. CONCLUSIÓN.....	35
9. BIBLIOGRAFÍA.....	36

1. RESUMEN

La brucelosis canina producida por *Brucella canis*, es una enfermedad infecciosa causante de aborto en perras e infertilidad en machos. Tiene importancia no solamente en criaderos, sino también en la clínica diaria debido a las pérdidas económicas que ocasiona; no debiendo olvidar su característica zoonótica. En nuestro país, el método de diagnóstico serológico empleado rutinariamente, es la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) utilizando antígeno de *Brucella ovis*. El objetivo del presente trabajo es comparar ésta técnica con la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT) empleando antígeno de *Brucella canis* M-, y con la RSAT previa adición de 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT). Nuestros resultados muestran que existe una buena concordancia entre IDGA y 2ME-RSAT pero débil con la RSAT. Creemos que la RSAT puede ser utilizada como técnica de tamiz para seleccionar los animales negativos, ya que tiene una alta sensibilidad. Dada la buena concordancia que existe con la IDGA, la 2ME-RSAT se presenta como una alternativa debido a su sencillez y porque requiere sólo de unos minutos para su realización. Cualquiera sea la técnica empleada, se deben confirmar los resultados positivos por medio de pruebas más específicas como ELISA indirecto o aislamiento bacteriano.

2. SUMMARY

Canine brucellosis produced by *Brucella canis*, is an infectious disease that causes abortion in bitches and infertility in males. Is important not only for breeders but also in the daily clinic, due to the economic losses and taking into account its zoonosis condition. In our country, the serologic diagnosis method used is the gel agar immunodiffusion test (IDGA) using *Brucella ovis* antigen. The objective of the present work is to compare this technique with the rapid slide agglutination test (RSAT) using *Brucella canis* M- antigen and with the RSAT with the addition of 2 mercaptoethanol (2ME-RSAT). Our results shows that exist a good concordance between IDGA and 2ME-RSAT, but a low one with RSAT. We think that the RSAT can be used like a screening test to select negative animals because of its high sensibility. Due to the good concordance that exist with the IDGA, the 2ME-RSAT is a good alternative methodology because it is quite simple and takes only a few minutes. Anyway, whatever the methodology used for the serological diagnostic, it is recommended to confirm the positive results with more specific techniques like indirect ELISA or bacteriological isolation.

3. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas que afectan el tracto reproductivo pueden implicar diversos grados de alteraciones en la fertilidad de los animales. Dentro de las etiologías microbianas en los problemas de índole reproductivo en los perros, las bacterias del género Mycoplasma, Ureaplasma, E. Coli, Staphylococcus y Streptococcus spp, se han asociado a infertilidad; sin embargo, la única bacteria que causa este cuadro en forma específica e irreversible es Brucella canis. (4,31) Esta es el agente causal de la brucelosis canina aún cuando Brucella abortus, Brucella suis y Brucella melitensis pueden enfermar esporádicamente al animal, causándole un cuadro autolimitado. (4,5)

Es una enfermedad infectocontagiosa de curso subagudo o crónico, caracterizada por una bacteriemia de larga duración, con presentación clínica o subclínica, que afecta principalmente el aparato reproductivo.

Es responsable de aborto en las hembras, muerte perinatal de los cachorros y de epididimitis e infertilidad en los machos, pudiendo llegar a causar grandes pérdidas económicas en criaderos. Además es de interés para la salud pública al ser una zoonosis; por lo que representa un riesgo sanitario tanto para los criadores como para los propietarios de animales de compañía. (6)

En humanos, la entidad se origina por contacto directo con caninos infectados, accidentes biológicos o exposición accidental, produciéndose una entidad de carácter súbito y sintomatología inespecífica que hace difícil su diagnóstico. Aproximadamente, 40 casos de infecciones humanas han sido reportados en varios países, sin embargo, el número actual se desconoce debido a que los casos son raramente diagnosticados o reportados. (7,15,22)

Brucella canis fue diagnosticada en el año 1966, cuando Carmichael confirma problemas de infertilidad y aborto en criaderos de raza Beagle de Estados Unidos. (10) En Uruguay la primera evidencia serológica de B. canis fue reportada por el Dr. Martino y col. en el año 1981.(28) Posteriormente, en 1993, los Dres. Bermúdez y Carreto realizan el primer aislamiento y tipificación de esta bacteria a partir de una perra con antecedentes de aborto. (Comunicación personal). Hasta el momento no hay estudios epidemiológicos que muestren cual es su prevalencia en nuestro país.

Es especialmente común en América Central y América del Sur, en los estados sureños de E.E.U.U. y ha sido diagnosticada en muchos otros países, incluyendo China, Japón y esporádicamente en Europa. Dentro de América, México y Chile presentan las prevalencias más elevadas, 28% y 30.5% respectivamente. (26) Estas cifras deben ser interpretadas con prudencia porque corresponden a seroprevalencias (y no a evidencia de bacterias) y la determinación de éstas está fuertemente influenciada por el tipo de test utilizado y por su interpretación

En los últimos años se ha notado en el ámbito mundial un aumento considerable de casos debido a la falta de control en criaderos y reproductores, y a la popularización

del paseo colectivo de perros, donde las hembras en celo están en estrecho contacto con otros ejemplares durante varias horas por día. (34)

Por ser la brucelosis canina una enfermedad insidiosa, los signos clínicos no son lo suficientemente específicos como para establecer un diagnóstico definitivo, sobre todo en animales prepúberes y no gestantes, dependiendo más de las pruebas serológicas y del aislamiento del agente causal.

OBJETIVOS:

- Diagnóstico serológico de *B. canis* por la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT) utilizando como antígeno una variante M- de *B. canis*.
- Diagnóstico serológico de *B. canis* por Inmunodifusión en gel de agar (IDGA) utilizando un antígeno de *B. ovis*.
- Adición de 2 mercaptoetanol a los sueros que resulten ser positivos a la RSAT (2ME-RSAT).
- Comparación entre IDGA y RSAT e IDGA y 2ME-RSAT.
- Creación de un banco de sueros positivos a *B. canis* para posteriores estudios.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. ETIOLOGÍA

4.1.1. Problemas de taxonomía

Desde el descubrimiento de esta bacteria en 1966, como causa de problemas reproductivos en el perro, ha habido algunas dificultades para identificarla de manera categórica por las técnicas clásicas. En 1968, el trabajo de Hoyer y su equipo sobre el ADN de este microorganismo contribuyó a clasificarlo en el género *Brucella*.

Pero algunos investigadores como Meyer se oponen a esta denominación. En efecto se apoyan sobre los resultados de numerosos tests definidos por el comité internacional de nomenclatura de bacterias, por el comité mixto FAO/ OMS de expertos en Brucelosis y por la subcomisión de taxonomía del género *Brucella*. Meyer rechaza que una nueva especie de *Brucella* fuera creada y recomienda que esta bacteria fuera clasificada como *B. suis* biotipo 5. Finalmente el nombre de *B. canis* fue adoptado y reconocido en 1980. Pero después de 1985, una sola especie *Brucella melitensis* es reconocida en el seno del género *Brucella*.

Las *Brucellas* clasificadas de especies en las antiguas nomenclaturas, son ahora clasificadas de biovars. Así, aplicando las nuevas reglas de taxonomía, *B. canis* se clasifica como *B. melitensis*, biovar, *canis*. Pero el subcomité de taxonomía del género *Brucella* acepta que se utilicen las denominaciones antiguas en las publicaciones que no tratan de taxonomía. Es por eso que en nuestra tesis nosotros llamaremos a la bacteria responsable de la brucelosis canina *Brucella canis*. (26)

4.1.2. Descripción de *Brucella canis*, cepa salvaie

Carmichael et Bruner publican desde el año 1968 los resultados de un estudio bacteriológico muy completo sobre esta nueva especie de *Brucella*.

La cepa de referencia fue designada por la sigla RM 6/66, ella fue aislada originalmente de fluidos alantoideos y de diferentes órganos (riñón, pulmón e hígado) de aborto de caninos de raza Beagle. Los cultivos fueron realizados sobre los medios comunes de cultivo de *Brucella* o sea, sobre gelosa o caldo triptosa o medio Albimi (agar tripticasa soja enriquecida con extracto de levadura). (26)

4.1.2.1. Características culturales

El crecimiento en agar triptosa en medio aeróbico es óptimo a 37°C. Pequeñas colonias redondas se reconocen a simple vista luego de 36 horas de incubación. Estas son de color blanco grisáceas y ligeramente traslúcidas.

Brucella canis es una especie de *Brucella* espontáneamente en fase rugosa. Luego de una semana de cultivo las colonias son muy mucoides y difíciles de levantar de su medio de cultivo. Esta fuerte viscosidad es en parte debida a las propiedades de algunos antígenos de superficie de *B. canis*.

Estas bacterias pueden igualmente crecer en medios líquidos como en caldo triptosa; luego de 48 horas de incubación, aparece una ligera turbidez y luego un sedimento viscoso se deposita después de algunos días de crecimiento. (26)

4.1.2.2. Características morfológicas

Microscópicamente *B. canis* es una bacteria inmóvil, acapsulada, no esporulada, de un largo de 0.5 a 2 micrómetros y de un ancho de 0.3 micrómetros.

En los aislamientos frescos tiene forma de coco pero luego de numerosas transferencias en medios artificiales se vuelve bacilar. Por lo tanto podemos calificar a este microorganismo como cocobacilo. Éste es gram negativo, pero en las preparaciones obtenidas a partir de cultivos muy jóvenes, tiende a retener parcialmente la coloración de Gram. (26)

4.1.2.3. Características bioquímicas y metabólicas

B. canis es una bacteria aeróbica estricta. Desde el punto de vista bioquímico tiene un metabolismo respiratorio oxidativo, pero ella no fermenta los hidratos de carbono. Es catalasa positivo, oxidasa positivo, ureasa positivo, indol negativo, no utiliza el citrato, no produce sulfuro de dihidrógeno y no crece en el medio de MacConkey.

4.1.2.4. Características antigénicas

Se distinguen dos tipos de antígenos:

A) de superficie

B) Internos o citoplasmáticos

A) Antígenos de superficie

Dentro del género *Brucella* existen dos categorías de antígenos de superficie: los lipopolisacáridos de tipo S (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*) y los lipopolisacáridos de tipo R (*B. ovis* y *B. canis*).

La diferencia entre las especies lisas (S) y las especies rugosas (R), se basa en la composición del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular, específicamente de la cadena polisacárida O. En el LPS de las cepas R, la cadena O está ausente o bien, presenta pocos residuos de formamido-deoximanosa. La importancia de la cadena O radica en que es el componente antigénico de superficie más expuesto de la pared celular y constituye por ello un antígeno inmunodominante en la respuesta humoral de los animales infectados, de hecho, es el mayor determinante antigénico involucrado en las reacciones serológicas de las pruebas de diagnóstico. La diferencia estructural entre las cadenas O, explica la reactividad serológica cruzada que ocurre sólo entre las especies rugosas, *B. ovis* y *B. canis*. (4) Los antígenos somáticos de *B. canis* son comunes con ciertos serotipos de *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus equii*, *Bordetella bronchiseptica* y cepas mucoides de *Pseudomonas aureginosa*. (4,7)

B) Antígenos internos

Los antígenos citoplasmáticos son proteínas específicas, más de 30 proteínas diferentes han sido identificadas. La mayoría de estos antígenos internos son comunes a todas las *Brucellas* R y S, pero no tienen ningún parecido con los de otras bacterias gram negativas. (26)

Las propiedades de estos tipos de antígenos tienen consecuencias sobre el serodiagnóstico.

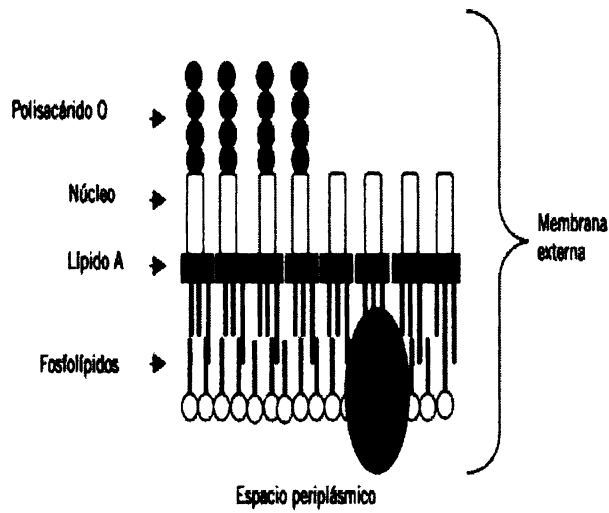
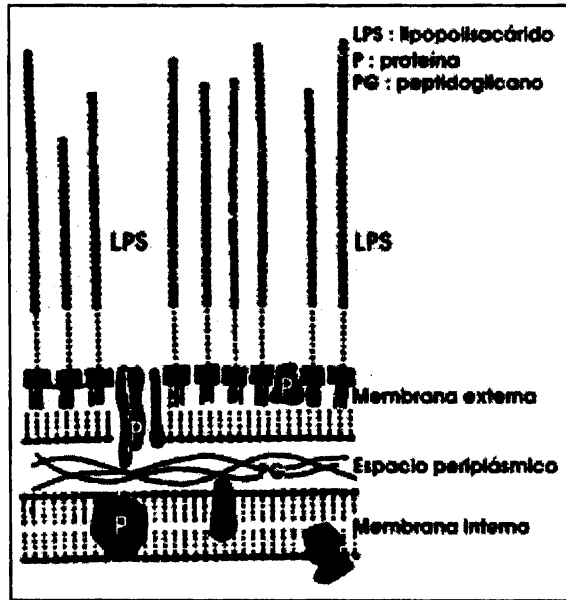


Figura 1: Diferencias en la estructura de la pared celular entre las especies R y S

4.1.2.5. Sobrevida y resistencia

B. canis puede sobrevivir en el ambiente por un corto período de tiempo aún en condiciones apropiadas y es rápidamente inactivada por los desinfectantes habituales (fenol, formol, cloro y derivados del amonio cuaternario). Resiste la congelación y descongelación. (4)

4.1.3. Propiedades biológicas de una variante M- de B. canis

Existe una variante seleccionada a partir de colonias transferidas numerosas veces en un caldo triptosa y pasada a un medio selectivo (agar glicerol y glucosa).

Esta variante es mucho menos mucoide que la cepa salvaje de B. canis. Ella es designada por la sigla SM por suave mucoide o M-. (26)

4.1.3.1. Caracteres culturales

Sobre medios sólidos la B. canis M- crece más lentamente que la B. canis M+.

Las colonias son menos granulosas y no tienen tendencia a adherirse a la superficie del agar luego de varios días de crecimiento.

En medio líquido no hay depósito de sedimento viscoso antes de 2 o 3 semanas de cultivo.

In vitro luego de numerosas transferencias en caldos, la variante M- puede dar colonias de tipo M- y M+, pero in vivo esta variante es genéticamente estable. (26)

4.1.3.2. Caracteres estructurales y antigénicos

Las dos variantes de B. canis poseen los mismos antígenos proteicos internos.

Un estudio comparativo de antígenos de la pared de los dos tipos M+ y M- de B. canis muestran que, desde un punto de vista serológico, ellos están muy próximos. Sin embargo, existen diferencias físicas importantes a nivel de los polímeros complejos que son parte integral de la pared pero que no intervienen en los determinantes antigénicos.

Así, los antígenos de superficie de *B. canis* M- tienen una talla y una carga negativa superiores a la variante M+ pero son menos hidrófobos. Tener en cuenta la característica hidrófoba de la pared es importante porque ha sido demostrado que en otras bacterias, el aumento de este carácter puede ponerse en paralelo con un aumento de la adherencia de la bacteria a las mucosas del huésped y a un aumento de su virulencia.

Esto es interesante a considerar cuando se sabe que la variante M+ es más virulenta que la M-. (26)

4.1.3.3. Poder patógeno

B. canis M- es muy poco patógena en relación con la cepa salvaje. La dosis infectante mínima es 5 veces superior. Esta variante no provoca aborto, los cachorros nacidos de madres infectadas son sanos y no produce epididimitis en el macho.

Una ligera adenomegalia está presente así como una bacteriemia que dura menos tiempo (un máximo de 9 meses) en comparación con la infección de la variante M+(6 a 64 meses).

Las propiedades de esta variante serán relevantes al momento de elaborar una vacuna. (26)

4.2. ESPECIES SENSIBLES

Al contrario que las brucellas en fase lisa que pueden infectar varias especies de animales diferentes, *B. canis* tiene un margen de huéspedes reducido, afectando sólo a perros y cánidos salvajes (zorros, coyotes) en condiciones naturales. Mediante inoculación experimental se ha provocado una infección leve y transitoria en bovinos, ovinos, cerdos, gatos, cobayos, conejos y ratones. (4,7)

No tiene predilección de raza, sexo ni edad afectando a cualquier animal.

La infección varía de acuerdo a la edad del animal, condiciones de alojamiento y localización geográfica. Las mascotas caninas en ambientes suburbanos tienen menor predominancia en comparación con los perros callejeros en áreas pobres, que reflejan alta densidad demográfica y cruzamientos no controlados. (7)

4.3. FUENTES DE INFECCIÓN

Los perros infectados enfermos o sin síntomas son excretores de gérmenes.

En la perra la fuente de infección son los fetos abortados, tejidos placentarios eliminados durante el aborto, secreciones vaginales post aborto (hasta la sexta semana) y durante el estro.

La leche de las hembras infectadas también contiene bacterias pero en menor número, siendo una fuente de infección para los cachorros, aunque generalmente éstos ya han sido afectados en el útero. (7)

En el macho el espermatozoides es la principal fuente de infección, entre la tercera y la undécima semana post infección se aísla la mayor cantidad de bacteria en el eyaculado de los perros infectados. Se nota eliminación intermitente en poca cantidad hasta 60 semanas post infección y puede continuar por lapsos cercanos a los 2 años. (7,22)

La orina es igualmente un material virulento. La excreción urinaria comienza pocas semanas después de la bacteriemia persistiendo por al menos 3 meses en concentraciones que varían de 10^3 a 10^6 microorganismos/ml. (5,7) Los datos parecen sugerir que los microorganismos en orina podrían ser derivados de los órganos reproductores (próstata, epidídimo, testículo) más que de la vejiga, al menos en el caso de los machos. (12) Esta diferencia se puede explicar por el trayecto de la uretra a través de la próstata (órgano que alberga un gran número de bacterias) y por la existencia de un flujo retrógrado de líquido prostático hacia la vejiga.

Otras fuentes de infección como las heces, las secreciones salivales y nasales no pueden estar completamente excluidas, pero ningún estudio ha mostrado su rol en la transmisión de la enfermedad.

4.4. FORMAS DE TRANSMISIÓN

La infección ocurre a través de la mucosa bucal, nasal, conjuntival y genital, siendo la vía oral la más común. La dosis mínima infecciosa oral para perros es cercana a 10^6 ufc/ml y de 10^4 a 10^5 ufc/ml por vía conjuntival. (4,5,7)

La transmisión puede ser directa por contacto estrecho durante un período prolongado, así como por vía venérea, siendo más frecuente cuando un macho infectado monta a una hembra sana que a la inversa.

El mayor riesgo de contaminación no sexual se da en el momento del aborto donde las secreciones, que pueden contener hasta 10^{10} microorganismos/mL, entran en contacto con las mucosas del animal sano.

La vía congénita o intrauterina adquiere importancia en la diseminación de la brucelosis a cachorros.

La transfusión sanguínea, inseminación artificial, utilización de vaginoscopios y jeringas también son medios de transmisión de la enfermedad. (7)

4.5. PATOGENIA

A diferencia de la mayoría de las bacterias patógenas, *Brucella* carece de los clásicos factores de virulencia asociados al daño tisular tales como cápsula, pili, flagelos, exotoxinas, exoenzimas, esporas, plasmidios y fagos lisogénicos. Se asume entonces que la virulencia estaría basada fundamentalmente en su capacidad de infectar células fagocíticas y no fagocíticas. Se piensa que esta capacidad estaría dada a su vez por la capacidad de homeostasis y propiedades de su membrana externa que le permitirían a la bacteria invadir, sobrevivir y replicarse en el interior de la célula hospedadora. (4)

Ella es marcadamente resistente a sustancias bactericidas presentes en los lisosomas y fluidos corporales y, a la acción bactericida de cationes que rompen la pared celular de la mayoría de las bacterias gram negativas y positivas. En las células fagocíticas, polimorfonucleares y mononucleares, usa mecanismos que evitan o suprimen la respuesta bactericida. (4)

Dicha capacidad de resistencia a la muerte intracelular que demuestra *Brucella*, explica la cronicidad de la infección y su persistencia en el huésped. (4)

Una vez que ingresa la bacteria en el perro, es rápidamente fagocitada por macrófagos donde es capaz de sobrevivir y multiplicarse gracias a su capacidad de

inhibir la formación del complejo fagolisosoma, impidiendo así la acción lítica de enzimas lisosomales. En la endocitosis realizada por neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos, se produce la activación de la degranulación y de otras células del sistema inmune a través de la liberación de citoquinas. *B. canis* resistiría la acción del peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos formados a través de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa que eliminan completamente estos radicales. Posteriormente, por vía linfática, la bacteria invade los ganglios regionales, los que se ven aumentados de volumen a expensas de una hiperplasia linfoide y de macrófagos. (4,5)

Si *B. canis* logra vencer la barrera inmunitaria, se propaga vía linfática o hematológica, provocando una bacteriemia 1 a 4 semanas posterior a la infección, la que puede persistir por largos períodos (6 a 64 meses). (4,5,7,22)

Los sitios preferenciales para la bacteria son:

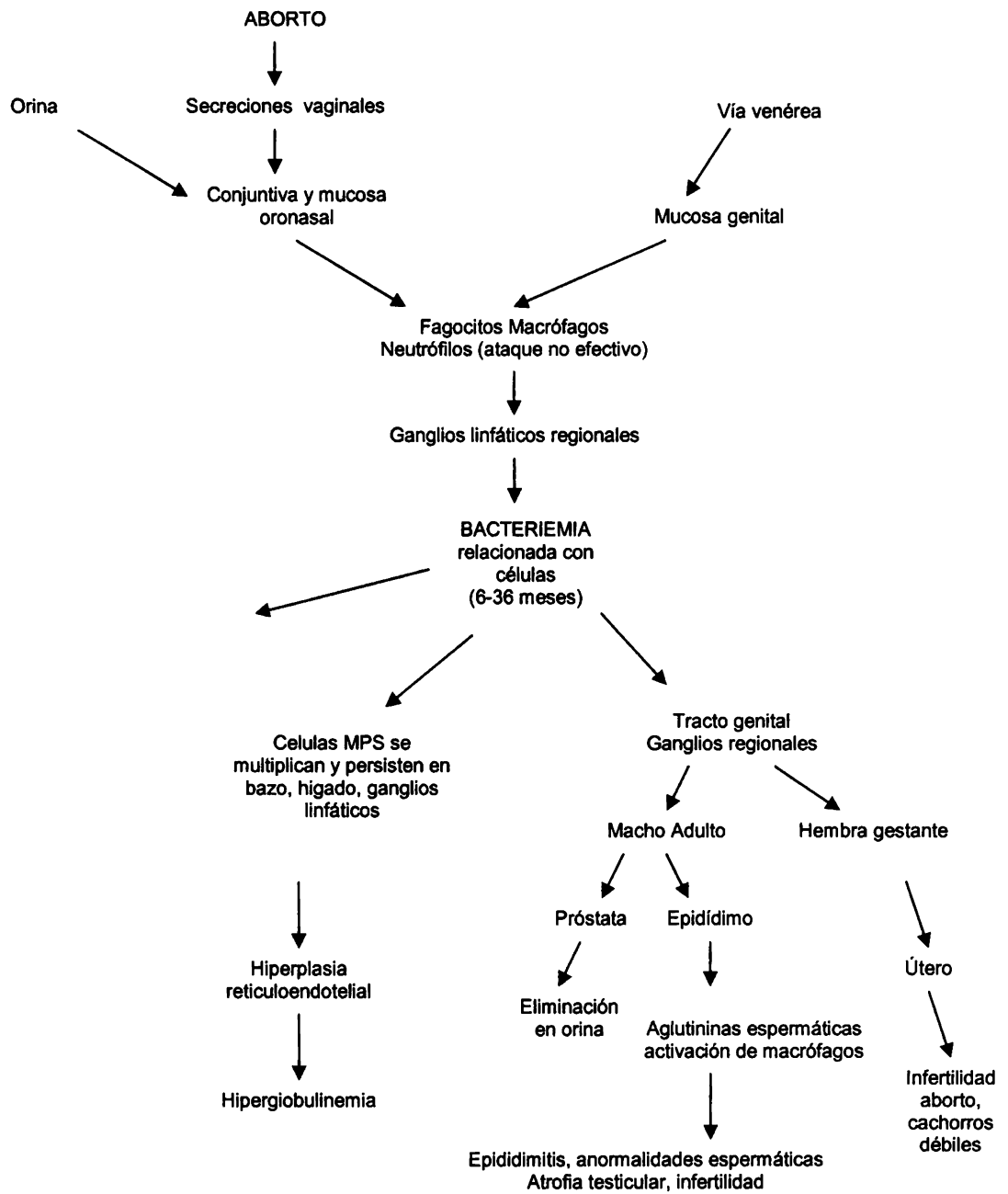
- los tejidos ricos en células reticulo-endoteliales: nódulos linfáticos, hígado, bazo; donde con la participación del sistema monocito-macrófago induce, nuevamente, hiperplasia linforeticular.
- los tejidos bajo la influencia de esteroides gonadales: próstata, epidídimo, testículos, útero y placenta, donde produce una fuerte infiltración de células inflamatorias. Es importante resaltar que el útero no grávido y en el período de diestro no es en general un sitio privilegiado para este microorganismo. (7)

Una vez colonizado el útero, la bacteria invade el epitelio trofoblástico que envuelve el embrión produciendo una placentitis. Existe replicación bacteriana a nivel intracelular de los trofoblastos y de allí pasan al epitelio corioalantoideo; tras destruir los trofoblastos, migra a otras células y tejidos vecinos. (4) La lesión histológica de base es una necrosis de coagulación de las vellosidades coriónicas. (26)

Otros órganos afectados son:

- Discos intervertebrales, donde llega a través de la circulación endoarterial provocando una discoespondilitis. (7)
- Ojo, donde provoca una inflamación y producción local de anticuerpos, lo que resulta en graves lesiones oculares (por ej. uveítis anterior)
- Órganos que tienen propiedades de filtración, pueden sufrir daños debido al depósito de inmunocomplejos dando lugar a glomerulonefritis, meningoencefalitis, etc. (7)

CUADRO I: PATOGÉNESIS SECUENCIAL DE LA BRUCELOSIS CANINA



Carmichael LE, Greene CE (1993)

4.5.1. Aspectos de la inmunidad

Como en todas las bacterias que son intracelulares, la inmunidad celular desempeña un rol fundamental, aunque no exclusivo. En la brucelosis la protección proviene de linfocitos CD8 y CD4. Los anticuerpos refuerzan la capacidad de los fagocitos toda vez que son capaces de cubrir a la bacteria. De hecho, los antígenos bacterianos son capaces de aumentar la formación, atracción y activación de gran número de macrófagos, sin la mediación de la inmunidad celular. Claramente, el LPS activa la fagocitosis y ciertas proteínas de la membrana bacteriana inducen la liberación de interleucinas que a su vez aumenta la infiltración de fagocitos en el bazo y la producción de nuevos fagocitos. La intensa respuesta inflamatoria hiperplásica, la inmunidad mediada por células y por inmunoglobulinas, contribuyen a la eliminación de la bacteria; de no lograrse, se inicia la cronicidad característica de esta enfermedad. (4)

4.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El período de incubación de la enfermedad es de 1 a 2 semanas.

Las infecciones ocultas son muy frecuentes, 30-50 % de los animales infectados no presentan síntomas. (26)

Los perros infectados rara vez presentan compromiso general; la pirexia es un signo poco común debido a la escasa cantidad de endotoxina presente en la pared de esta bacteria.

En las hembras, lo más frecuente es el aborto súbito al día 45-55 de gestación. Un estudio de Carmichael y Kenney en 1968 muestra que el 85% de las perras abortan en este período (ver fig.2). Este se caracteriza por secreción vaginal de color café o gris verdosa que dura de una a seis semanas. Los fetos abortados pueden observarse parcialmente autolizados sin una lesión característica que haga sospechar de brucelosis. Estos presentan edemas subcutáneos y zonas congestivas o hemorrágicas en la región abdominal. (4,7)

En ausencia de aborto, las hembras pueden parir crías débiles que terminan por morir dentro de las primeras 48 hs, o bien, parir cachorros que sobreviven y que como única manifestación clínica de la infección presentan una linfadenopatía periférica generalizada, al menos hasta la pubertad. Menos frecuente que el aborto es la muerte embrionaria que ocurre tempranamente y que se percibe mas bien como falla en la concepción. Es importante recordar que la infección no produce alteración en el estro de la perra, por lo tanto una hembra con reabsorción vuelve a presentar su celo en el próximo ciclo. (4,7)

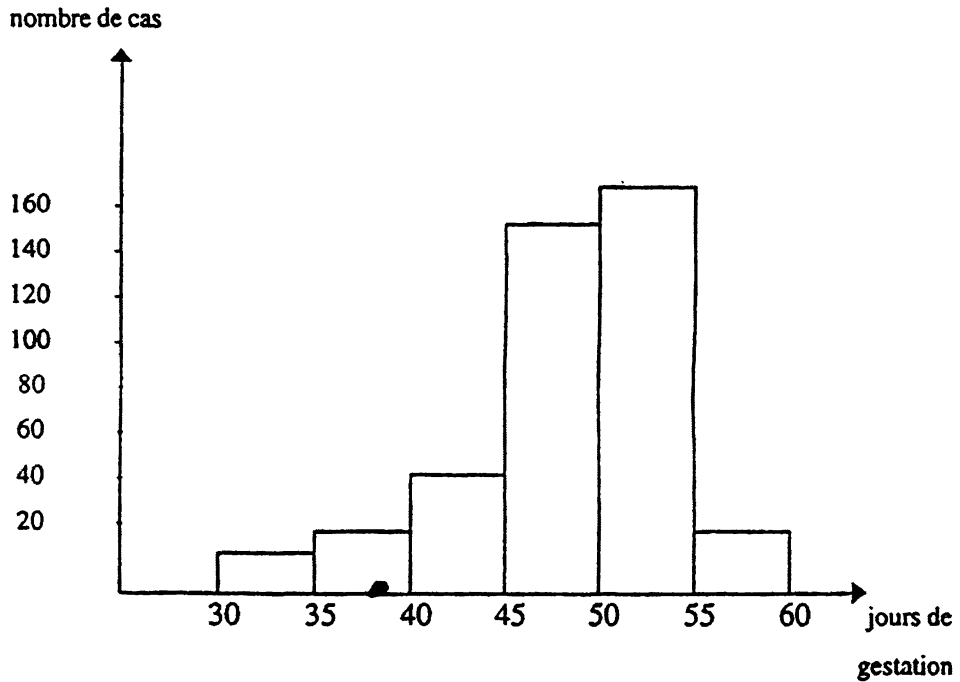


Figure 2: Fréquence de l'avortement brucellique en fonction du stade de gestation (22).

Figura 2: Porcentaje de abotos en función del estado de gestación.

Léone AC (2000)

CUADRO II: ACCIDENTES GENITALES OBSERVADOS LUEGO DE LA INFECCIÓN POR B. CANIS

Aborto seguido de un celo normal	12	10
2 abortos consecutivos	32	26
3 abortos consecutivos	6	5
Aborto seguido de esterilidad por lo menos en dos ciclos seguidos	12	10
2 abortos separados por un celo normal	12	10
Esterilidad aparente al menos en 2 ciclos consecutivos	28	23
Esterilidad aparente al menos en 2 ciclos consecutivos seguidos de un aborto	8	6
2 abortos seguidos de un celo normal	12	10

Léone AC (2000)

En los machos produce epididimitis y orquitis no supurativa acompañada de extravasación de espermatozoides a través de los túbulos seminíferos. El escape de éstos explica una autosensibilización con aparición de anticuerpos antiespermatozoides y reacciones de hipersensibilidad tardía contra antígenos espermáticos, situación que contribuye a perpetuar la epididimitis y detener la espermatogénesis (azoospermia) en casos crónicos. Entre las alteraciones espermáticas se destacan la disminución del volumen del eyaculado con presencia de gran cantidad de células inflamatorias y de hasta un 90% de espermatozoides anormales. Dentro de las anomalías más frecuentes se señalan células espermáticas inmaduras, retención de gota citoplasmática proximal, presencia de colas enrolladas, desprendimiento de cabezas y aglutinación cabeza-cabeza. Todo esto explica la infertilidad irreversible, característica de los machos infectados. (4,5,7)

Adicionalmente, se observa dermatitis escrotal producto no sólo del estado de hipersensibilidad sino también del exceso de lamido por dolor. En estados más crónicos, estos procesos inflamatorios terminan con atrofia testicular uni o bilateral. (4,7)

Otros signos más generales de la enfermedad consisten en la pérdida de brillo y sequedad del pelo, linfadenopatía generalizada, cambios de comportamiento tales como indiferencia al medio, anorexia y depresión.

Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes corresponden a osteomielitis, esplenomegalia, poliartritis, discoespondilitis, glomerulonefritis, uveítis anterior recurrente, edema corneal y meningoencefalitis. (4,7)

Un estudio reveló que la discoespondilitis se produce con mayor frecuencia en perros de talla grande, que los machos se afectan 2 veces más que las hembras y que los discos intervertebrales de la región toracolumbar y lumbosacra son las más afectadas. (25)

En otro ensayo, se estudió la prevalencia de lesiones oculares en caninos examinados por brucelosis canina en 19 hospitales veterinarios en los EEUU y Canadá, entre marzo de 1964 y marzo del 2003, encontrándose un valor del 14.2% (38/313). (32)

Si bien se han descrito casos de recuperación espontánea entre 1 a 5 años posinfección, ésta es poco frecuente. Estos animales presentan bajos títulos de anticuerpos y son inmunes a la reinfección. A nivel experimental se ha demostrado que perros infectados y recuperados mediante tratamiento con drogas específicas quedan susceptibles a una nueva infección por vía oronasal. (4,7)

4.7. BRUCELOSIS EN EL HOMBRE

Esta enfermedad es una zoonosis de baja intensidad. Los humanos son susceptibles a *B. canis*, pero las infecciones no son comunes, y ellas son usualmente ligeras.

Los síntomas clínicos consisten en fiebre, cefaleas, escalofríos, pérdida de peso, linfadenopatía, faringitis y malestar general, presentando como complicaciones raras: endocarditis, meningitis, artritis, hepatitis y abscesos viscerales. (7,14,15)

4.8. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico aún continúa siendo uno de los mayores problemas en el control y prevención de esta enfermedad.

4.8.1. Elementos clínico-epidemiológicos

4.8.1.1. Sospecha

Los síntomas y las lesiones provocadas por la infección por *B. canis* no son específicos, por lo tanto el diagnóstico clínico es imposible, solo podemos emitir sospechas.

En el plano clínico, la brucelosis debe ser sospechada cuando los animales sufren de problemas reproductivos (abortos, esterilidad, epididimitis, etc.).

En el macho, las anomalías del espermiograma permiten reforzar las sospechas, pero éstas no son específicas de *B. canis*.

En caso de discoespondilitis, hay que pensar en incriminar a *B. canis*.

Los valores hematológicos y bioquímicos no están alterados o son inespecíficos en la brucelosis canina. La hiperglobulinemia con hipoalbuminemia concomitante ha sido el hallazgo más constante en casos de infección crónica. (7,20)

En el plano epidemiológico, esta enfermedad debe ser sistemáticamente buscada en aquellos criaderos en los que la tasa de aborto supere el 2%, o cuando más del 10% de las perras son servidas sin éxito, estas cifras están consideradas como de umbral patológico. (26)

4.8.1.2. Diagnóstico diferencial

En la hembra hay que distinguir el ataque de *B.canis* de todas las otras causas de infertilidad, aborto y mortalidad neonatal.

Los principales agentes infecciosos, bacteriológicos, virales y parasitológicos capaces de provocar estos síntomas se describen en el cuadro III.

Las bacterias responsables de aborto son a menudo no específicas. Algunas existen normalmente en estado saprófito en las vías genitales femeninas (como *E.coli* o estreptococos beta hemolíticos del grupo G) pero ellas pueden ser el origen de la infección si las defensas del organismo maternal disminuyen o si el número de gérmenes aumentan anormalmente (por ejemplo cuando las condiciones de higiene del entorno son muy malas).

En el macho las orquiepididimitis pueden ser causadas por *B.abortus* o por la multiplicación excesiva de bacterias saprófitas de la piel que van a contaminar los órganos genitales por vía ascendente.

En el caso de la discoespondilitis, el agente causal más comúnmente implicado es el *Staphilococcus aureus*.

Por todo esto, la confirmación por medio del laboratorio se hace imprescindible para el diagnóstico de *B.canis*. (26)

CUADRO III: AGENTES INFECCIOSOS RESPONSABLES DE ABORTO Y MORTALIDAD NEONATAL EN PERRAS.

Bacterias	Específicas
	<i>Brucella canis</i> , <i>Mycoplasma canis</i>
	No específicas
	<i>Brucella abortus</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Salmonella</i> sp
	<i>Ureaplasma</i> sp, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Chlamydia psittaci</i>
	<i>Coxiella burnetti</i> , <i>Pseudomona</i> sp, <i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Virus	Herpes virus canino, Distemper
Parásitos	<i>Toxoplasma gondii</i>

Léone AC (2000)

4.8.2. Diagnóstico de laboratorio

4.8.2.1. Diagnóstico directo: Bacteriología

El aislamiento bacteriano es el método ideal, sin embargo esta bacteria es de difícil cultivo y lento desarrollo. *B. canis* tiene un tiempo de multiplicación más lento que la mayoría de las bacterias comensales contaminantes, es necesario por ello utilizar medios selectivos como agar Albimi o agar Brucella para su cultivo. A diferencia de otras especies del género, *B. canis* no necesita la adición de CO₂ para crecer. Su desarrollo in vitro es lento, pudiendo aparecer a los 2 a 3 días de incubación a 37 °C las primeras colonias, pequeñas y de apariencia translúcida. (4)

Para el aislamiento, las muestras de sangre son válidas a partir de la primera semana post infección, sin embargo, dado que la bacteriemia es intermitente y su presencia no se puede predecir clínicamente (ausencia de pirexia), su interpretación debe ser cautelosa, es decir, un cultivo negativo no descarta totalmente la infección. (4)

En algunos perros, en especial los machos, el urocultivo resulta positivo, cuando los hemocultivos son negativos; sin embargo, a menos que se realice cistocentesis, el aislamiento de *B. canis* en orina es difícil, por la abundancia de contaminantes. La recolección de semen por eyaculación es útil para el cultivo durante los primeros 3 meses de la infección, cuando es mayor la concentración de microorganismos. (7)

B. canis puede aislarse de tejidos obtenidos en la necropsia. Las fuentes más frecuentes son: ganglios linfáticos, bazo, hígado, medula ósea y órganos reproductores de los machos. En las hembras, los tejidos más usuales para el aislamiento son: útero grávido o en estro, placenta y líquidos vaginales o uterinos. (7,22)

CUADRO IV: CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *B. CANIS*

Exudado posaborto	Cuando se presenta	Positivos
Placenta	Cuando se presenta	Positivos
Material abortado	Cuando se presenta	Pueden ser negativos
Semen	3-11 semanas después de la infección	Positivos
	12-60 semanas después de la infección	Positivos pero se eliminan pocos microorganismos
	> 60 semanas después de la infección	Negativos
Sangre	5-30 semanas después de la infección	100 % Positivos
	6-12 meses después de la infección	>80% positivos

	28-48 meses después de la infección	50-80% positivos
	48-58 meses después de la infección	25-50% positivos
	> 58 meses después de la infección	< 25% de la infección
Epididimo	35-60 semanas después de la infección	50-100% positivos
	> 100 semanas después de la infección	Negativos
Orina	8-30 semanas después de la infección	Por lo general positivos; los machos eliminan más microorganismos
Próstata	Hasta 64 semanas después de la infección	Por lo general positivos
Ganglios linfáticos, bazo y médula ósea	Quando el animal es bacterémico	Por lo general positivos
	Quando el animal no es bacterémico	Positivos o negativos
Ojo	Quando hay uveitis	Por lo general positivos
Disco intervertebral	Quando hay discoespondilitis	Positivos o negativos

Léone AC (2000)

Medios de cultivo utilizados

Los medios de cultivo de gelosa sólidos utilizados para el cultivo de otras especies de *Brucella*, son satisfactorios para aislar *B. canis*, como ser agar dextrosa con suero, agar triptosa con suero y agar tripticasa soja. El medio selectivo recomendado por Kuzdas y Morse (1953) puede prepararse agregando al medio básico cicloheximida, bacitracina y polimixina B, principalmente para el cultivo de material que pueda estar contaminado (muestras que no sean sangre) o si realizamos un repique a partir de un caldo. (2,26) Para los hemocultivos se recurre esencialmente al caldo tripticasa soja enriquecido con extractos de levadura. (26)

Los medios de cultivos líquidos son menos utilizados.

4.8.2.2. Diagnóstico indirecto: Serología

Frente a las desventajas del aislamiento como método tradicional de diagnóstico, las técnicas serológicas que determinan la presencia y título de anticuerpos anti *B. canis* constituyen hoy el método más utilizado, ya que se realizan en un corto tiempo y son fáciles de llevar a cabo. Tienen como contrapartida el hecho de que se pueden cometer errores en la interpretación debido a la reactividad cruzada con otros microorganismos. Además, los resultados suelen ser negativos cuando el animal ha estado infectado por menos de 4 semanas, cuando tiene una infección crónica o ha recibido antibioterapia; ya que los títulos de anticuerpo permanecen altos en tanto

persista la bacteriemia y cuando esta última se torna intermitente o remite (como sucede en la infección crónica) declinan los títulos y pueden tornarse equívocos o negativos por falta de estimulación antigénica. (23)

Pruebas serológicas más utilizadas:

- La prueba rápida de aglutinación en placa (RSAT) es económica, rápida, sensible (99 %), y detecta anticuerpos en forma temprana con resultados positivos 3-4 semanas posinfección (PI); tiene como desventaja que no es específica, dando falsos positivos. Su baja especificidad (<50%) puede mejorarse con la adición a los sueros de 2-mercaptoetanol (ME- RSAT), ya que éste destruye los puentes disulfuros de las IgM que son las responsables de dar reacciones inespecíficas. Una modificación de la RSAT, que utiliza la variante M- de B. canis reduce aún más el promedio de resultados positivos falsos obteniéndose una especificidad cercana al 90% sin alterar la sensibilidad.
- La prueba de aglutinación en tubo (TAT) es una técnica semicuantitativa, de sensibilidad similar a la RSAT, obteniéndose resultados a las 3-6 semanas PI. Lamentablemente se obtienen los mismos resultados inespecíficos y no está bien estandarizada entre los laboratorios. El agregado de 2- Mercaptoetanol también incrementa la especificidad (ME-TAT).
- La inmunodifusión en gel agar (IDGA) también es muy utilizada. Empleando antígeno lipopolisacárido de la pared celular, es más específica que los métodos de aglutinación y detecta anticuerpos entre las 5 a 10 semanas PI. Empleando antígenos internos (proteínas citoplasmáticas) es más sensible en la detección de casos crónicos (hasta 12 meses después del cese de la bacteriemia) cuando otros análisis son ambiguos o negativos, detectando anticuerpos a las 8 a 12 semanas PI. (22) Estos antígenos internos sólo son compartidos por otras brucelas.

Otras técnicas:

- La reacción de fijación de complemento (FC) es ampliamente utilizada para el diagnóstico de infección por B. ovis y B. abortus, presentando sensibilidad y especificidad elevadas. Ésta detecta la IgG que es más específica que la IgM, disminuyendo el número de falsos positivos. Sin embargo, es poco utilizada en la rutina para el diagnóstico de infección de caninos por B. canis. (14)

- La contrainmunolectroforesis es utilizada ocasionalmente para el serodiagnóstico de la brucelosis canina. Es una técnica válida pero su utilización no se ha desarrollado porque no ofrece más avance que los reportados con la IDGA.
- La inmunofluorescencia indirecta (IFA) es empleada por pocos laboratorios debido a la poca sensibilidad y especificidad. Los resultados del Laboratorio de Diagnóstico de Cornell indican una alta proporción de falsos positivos con esta prueba. (8)
- La técnica de ELISA es una de las últimas que han sido descritas, la ventaja recae en su capacidad de detectar tempranamente la infección cuando las técnicas de aglutinación tradicionales han sido negativas. Puede emplear como antígeno extractos de la pared celular de *B. canis* M- siendo más específica pero menos sensible que los métodos convencionales (de aglutinación e IDGA). Cuando utiliza como antígeno proteínas citoplasmáticas, tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la brucelosis canina. (33)

Hasta la fecha, ninguna de las pruebas serológicas disponibles se considera de mayor eficiencia en el diagnóstico de la brucelosis canina, debiendo en lo posible corroborar un resultado positivo ya sea mediante otra prueba serológica más específica (ELISA) o bien por intentos de aislamiento. (4)

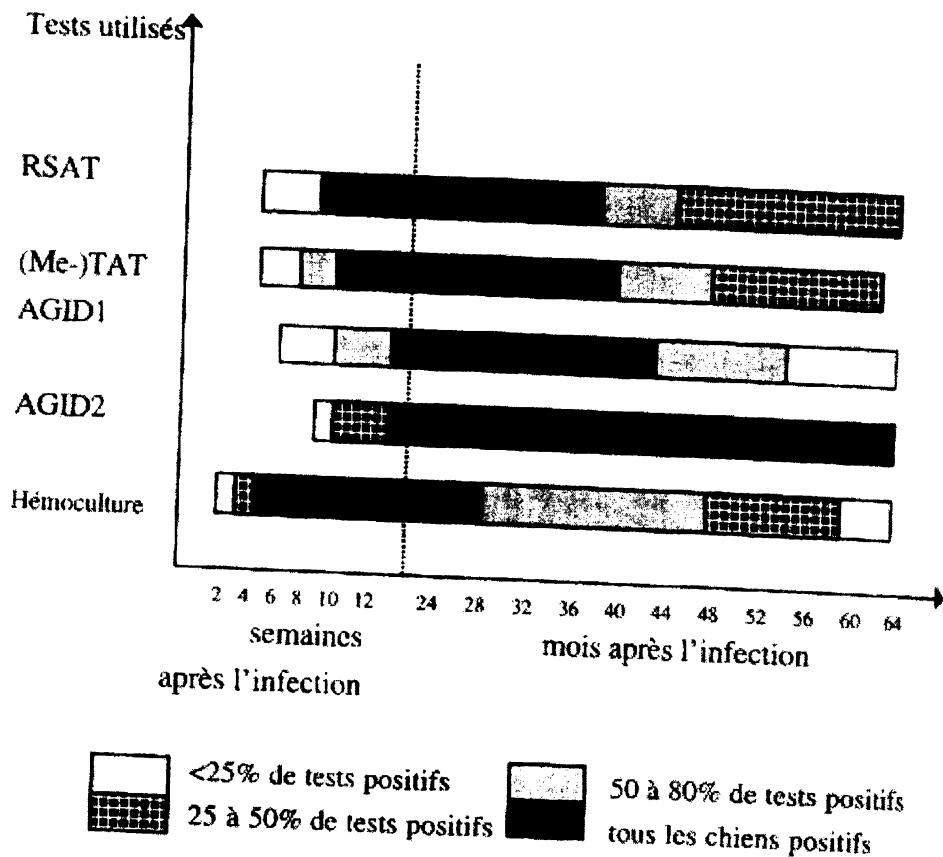


Figura 3: Sensibilidad de los diferentes test serológicos en función del tiempo sobre perros infectados experimentalmente (Carmichael, Zoha, Flores-Castro, 1983). Léone AC (2000)

4.9. TRATAMIENTO

El tratamiento es caro y es difícil alcanzar la cura, especialmente en machos crónicamente infectados. Se requieren cultivos de sangre repetidos y monitoreo serológico por al menos 3 meses después del tratamiento. Es común que la enfermedad reaparezca después del tratamiento con antibióticos. Aún si el organismo es exitosamente eliminado, los machos frecuentemente quedan estériles por el daño irreversible de los testículos y epidídimos. (8)

Se cree que la castración del macho o de la hembra elimina en gran medida el riesgo de transmisión por el perro infectado, aunque los organismos no son eliminados del cuerpo. Todos los perros castrados deben recibir una serie de tratamiento antibiótico.(8)

Los resultados más exitosos y prácticos han sido obtenidos con una combinación de tetraciclina y estreptomina administradas durante los primeros 3 meses de la infección. Se ha alcanzado un promedio de curación de más del 80% en criaderos infectados, donde los perros inicialmente diagnosticados como infectados fueron sacrificados, y los casos adicionales (en la primera parte de la infección) fueron tratados. La dihidroestreptomina (10 mg/kg IM, 2 veces al día) es administrada por 7 días con la tetraciclina (25 mg/kg vía oral, 3 veces al día) por 4 semanas. Durante los últimos 7 días del tratamiento con tetraciclina, otra vez se administra la estreptomina. En algunas instancias en que el primer tratamiento falla, una segunda serie ha sido exitosa. (8)

Existen diversos protocolos para el tratamiento de la brucelosis canina que se describen en el cuadro V.

Es importante resaltar que la respuesta a la terapia antibiótica es más exitosa en infecciones tempranas y a medida que va aumentando la cronicidad el pronóstico es más desfavorable. (8)

El fracaso terapéutico es atribuido a la localización intracelular de la bacteria y a la colonización de tejidos donde la perfusión de ciertas drogas es escasa. (4,26)

El tratamiento no es recomendado para perros en reproducción. (8) Debido al costo del tratamiento, costo de mantener animales subfértiles e infértiles, reducción global de la eficiencia reproductiva de la colonia, disminución del número de cachorros que sobreviven al destete y persistencia de la infección en la colonia, finalmente es más económico analizar y excluir que intentar el tratamiento. (22)

A diferencia del perro, los humanos infectados usualmente responden rápidamente a los antibióticos (tetraciclinas o tetraciclinas y estreptomina).

CUADRO V: RESULTADOS DE ESTUDIOS SOBRE LOS TRATAMIENTOS MÉDICOS DE LA BRUCELOSIS CANINA (Según Nicoletti y Chase).

Tetraciclina	10 mg/kg	Oral, 14 días	0/5
Tetraciclina más sulfadimetoxina	10 mg/kg 23 mg/kg	Oral, 14 días Oral, 14 días	0/6
Minociclina + Estreptomina	10 mg/kg 4,5 mg/kg en 2 veces	Oral, 14 días I/M, 7 días	15/18
Minociclina	10 mg/kg	Oral, 14 días	3/11
Oxitetraciclina + Estreptomina	20 mg/kg inyect. 30 mg/kg en 2 veces	I/M, 4 inyecciones por 3 semanas I/M, los 7 primeros días	19/24
Tetraciclina después	60 mg/kg en 3 veces	Oral, 14 días	0/6
Estreptomina	22 mg/kg en 2 veces	I/M, 14 días	

después			
Trimetoprim-sulfam	30 mg/kg en 2 veces	Oral, 14 días	
Ampicilina después	750 mg en 3 veces	Oral, 21 días	3/4
Tetraciclina más	750 mg en 3 veces	Oral, 21 días	
Estreptomina	500 mg en 2 veces	Oral, 21 días	
Tetraciclina después	750 mg en 3 veces	Oral, 21 días	4/4
Tetraciclina más	750 mg en 3 veces	Oral, 21 días	
Estreptomina	500 mg en 2 veces	I/M, 21 días	
Tetraciclina	750 mg en 3 veces	Oral, 21 días	0/4
Ampicilina	750 mg en 3 veces	Oral, 21 días	0/4
Tetraciclina más	30 mg/kg en 3 veces	Oral, 30 días	15/20 y 17/20
Estreptomina	3,4 mg/kg	I/M día 1 ^a a día 7, después día 24 , después día 30	después del 2 ^o tratamiento
Tetraciclina más	60 mg/kg en 2 veces	Oral, 28 días	81/86
Estreptomina	20 mg/kg.	I/M, 14 días	

Léone AC (2000)

4.10. CONTROL Y PREVENCIÓN

No han sido exitosos los intentos de desarrollo de una vacuna adecuada que induzca inmunidad, y que no provoque una respuesta serológica que interfiera con el diagnóstico. Debido a la imposibilidad de un tratamiento médico que garantice la curación bacteriológica y en ausencia de una vacuna, la prevención de la infección debe ser la principal estrategia de control. (8)

La prevención requiere de pruebas anuales de todos los perros reproductores y el análisis de todos a ser introducidos en un kennel. Sólo los perros probados no infectados deben ser utilizados. (8)

La RSAT se recomienda como prueba de screening, pero los resultados positivos siempre deben ser evaluados con otros métodos más específicos.

Deben ser requeridos dos resultados negativos hechos con un intervalo de 4 a 6 semanas, para los perros a ser introducidos en la colonia reproductora. Las dos pruebas detectarán a los perros que puedan estar incubando la enfermedad. Si la hembra aborta, asumir la infección hasta que se pruebe lo contrario. La hembra debe ser tenida en aislamiento, y el local desinfectado. Si un perro macho pierde interés en servir, o desarrolla anomalías testiculares y pobre fertilidad, debería ser examinado por brucelosis. (8)

Es una enfermedad muy insidiosa, en consecuencia, en el momento en que se reconoce el caso índice (primer animal del grupo en que se reconoce la enfermedad), el clínico debe suponer que muchos miembros de la colonia han tenido la posibilidad de exponerse y se encuentran en diversas etapas de incubación. Aunque quizás no sea

factible detectar a estos animales recién infectados mediante las pruebas serológicas e incluso por hemocultivo, ellos son capaces de transmitir la infección a otros. (23)

El manejo de criaderos infectados lleva tiempo y es caro. Tan pronto se diagnostica la brucelosis canina en un criadero, deben ser implementadas vigorosas medidas hasta que la enfermedad haya sido erradicada. Los criaderos infectados deben estar cuarentenados, aunque en la mayoría de los estados o países no hay regulaciones formales. La falta de tales medidas ha conducido a una diseminación amplia, aún internacional, de las infecciones por *B. canis*. (8)

El análisis y eliminación de los perros infectados es el único método probado de erradicación de *B. canis* de un kennel infectado. Debe hacerse un intento para identificar la fuente de la infección, desafortunadamente, esto es difícil de alcanzar ya que los dueños de los criaderos no son proclives a admitir la culpabilidad. (8)

Los clientes siempre deben estar informados de los peligros potenciales para la salud al mantener mascotas infectadas por *B. canis*. Ha de tenerse cuidado en el laboratorio, cuando se manejan o pipetean muestras remitidas para pruebas diagnósticas y los veterinarios realizarán una buena higiene cuando examinen perros sospechosos, en especial perras que abortaron. (7)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La población canina estudiada está compuesta por animales de diferente raza, sexo, y edades comprendidas entre 1 y 12 años con y sin sintomatología sospechosa de la enfermedad.

De un total de 100 muestras, 39 provinieron del Hospital de la Facultad de Veterinaria del Uruguay, 22 de clínicas veterinarias particulares, 21 de un refugio ubicado en el barrio La Blanqueada y 18 de otro refugio en el barrio Casavalle.

En el momento de la extracción, se llenó una ficha clínica individual, conteniendo datos del propietario y del animal.

Se extrajo sangre por punción con jeringa hipodérmica de la vena radial (5 cc), en forma aséptica e individual, sin anticoagulante, y se procesó en el Laboratorio del Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria del Uruguay.

En el laboratorio se obtuvo el suero por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos y fue mantenido a -20 °C hasta el momento de ser procesado.

5.1. TÉCNICA DE RSAT (RAPID SLIDE AGGLUTINATION TEST)

El antígeno utilizado en este trabajo fue *B. canis* (M-) cedido por el Dr. Bermúdez del Área de Bacteriología, Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria del Uruguay. En la elaboración del mismo se utilizó la cepa de referencia RM-6/66 de *B. canis* cedida por el Dr. Casas Olascoaga, y la técnica empleada fue la descrita por Carmichael y Joubert (1987).

La técnica consiste en los siguientes pasos:

- Homogenizar a temperatura ambiente el antígeno
- En un portaobjeto, mezclar 10 ul de suero con 10 ul de antígeno
- Rotar suavemente el portaobjeto con la mezcla durante 2 minutos
- Leer rápidamente al microscopio (10 x)

Interpretación de resultados

NEGATIVO: Se observa el líquido rosado homogéneo.

POSITIVO: Se observan grumos rosados sobre el fondo translúcido. (21)

Es importante resaltar que los sueros a examinar deben estar libres de glóbulos rojos.

5.2. TÉCNICA DE 2ME-RSAT (2 MERCAPTOETANOL RSAT)

- Mezclar 25 ul del suero con 25 ul de 2-Mercaptoetanol 0.2M en un portaobjetos
- Esperar 1 minuto
- Agregar 50 ul del antígeno agitando suavemente el portaobjetos durante 2 minutos
- Leer rápidamente al microscopio (10x)

5.3. TÉCNICA DE IDGA (INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR)

El antígeno utilizado en esta técnica fue la cepa Reo 198, cedido por el Sr. Pablo Llerena de la División Laboratorios Veterinarios Miguel C. Rubino, del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay.

Es un extracto salino de *B. ovis* que contiene lipopolisacárido rugoso, específico en precipitación en gel para brucellas rugosas, y algunas proteínas de membrana que son compartidas con cepas lisas y rugosas de brucellas.

Preparación del gel:

- Buffer borato 30 mM, pH 8.3

Disolver 0.19 g de ácido bórico (H_3BO_3) + 0.72 g de KCl + 95 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 8.3 con Na (OH) 0.2 N. Llevar el volumen a 100 ml y conservar a 4 °C.

- Gel agarosa- borato

Disolver 0.8 g de agarosa + 5 ml de solución borato + 95 ml de suero hipersalino

(NaCl al 11 %). Agitar a baño María hasta que la solución se haga homogénea y transparente. Añadir 0.1 % de azida de Na para prevenir la contaminación.

Preparación de las placas con el gel:

Con una pipeta colocar 20 ml del agar fundido en una placa de petri. La técnica más apropiada es comenzar a descargar el gel por los bordes de la placa y luego se corre lentamente la pipeta al centro con la finalidad de cubrir uniformemente toda la superficie.

Se deja solidificar unas horas a temperatura ambiente y luego se lleva a una refrigeradora a 4 °C por 48 hs para terminar de facilitar la solidificación de la capa de agar.

Pasado este tiempo, perforar el agar con un perforador con disposición en rosetas de 6 con un pocillo central. El tamaño de los hoyos y la distancia entre un pocillo y el otro deben ser de 3 mm.

Llenado de los pocillos

Inmediatamente después de preparada la placa de agar se procederá a montar los sueros y el antígeno para evitar que la deshidratación provoque una absorción muy rápida de los reactivos.

Los sueros problemas se depositan en los hoyos perisféricos reservando uno de los mismos para el suero control positivo de un carnero infectado. Se llenan los pocillos con 0.03 ml de los sueros, utilizando pipeta automática o en su defecto pipeta Pasteur. En el caso de que se examinen menos de 5 sueros, los hoyos restantes deben llenarse con solución salina.

Colocar 0.03 ml del antígeno en el pocillo central.

Una vez que se hayan depositado el antígeno y los sueros, se debe manipular la placa con cuidado para evitar la salida de los reactivos de los hoyos.

Por último, las placas se incuban durante 24-48 hs a temperatura ambiente (20-25 °C) en cámara húmeda.

Lectura e interpretación de los resultados:

La lectura debe realizarse bajo un haz suave de luz indirecta y sobre fondo oscuro, siendo aconsejable utilizar una lupa.

Los sueros que presenten bandas típicas de precipitación se clasifican como positivos y en los que no se observan dichas bandas se clasifican como negativos.

Cuando no se está seguro de la lectura una vez transcurridas las 48 hs de incubación, inundar los porta con abundante cantidad de citrato de Na al 15 % en agua durante 15 min; las bandas inespecíficas desaparecen normalmente en este tiempo. (30)

Principio de la técnica:

Las macromoléculas pueden difundir libremente a través de geles, estando dicha difusión limitada por la concentración del gel.

Utilizando como base el agar disuelto en electrolitos, se puede hacer migrar antígenos y anticuerpos, de modo que interaccionen al encontrarse, formando precipitados que se visualizan como nítidas bandas de precipitación. (30)

Factores a tener en cuenta para que se produzca la reacción:

- Antígenos y anticuerpos deben estar en solución.
- Disposición adecuada de los sueros y del antígeno; se deben colocar en hoyos opuestos ya que la difusión se produce en forma radial.
- La distancia entre el antígeno y el suero, y el peso molecular influyen en el tiempo requerido para que ocurra la precipitación (PM mayores de 1).
- La temperatura óptima es de 20 a 25 °C (por ejemplo, si es más elevada se acelera la reacción pero con pérdida de definición).
- El tamaño de los hoyos deben estar estandarizados (3mm) para que la proporción de los reactivos sea la adecuada.
- Las concentraciones de antígeno y anticuerpo deben ser ajustadas para que la reacción de precipitación se produzca en la zona de equivalencia (distancia media entre ambos reservorios), para lo cual es importante la titulación de cada lote de antígeno con un suero control conocido, a efecto de lograr la equidistancia en la reacción y una mayor nitidez de las bandas. En general, para sueros no diluidos, el antígeno debe estar en una concentración aproximada de 1 mg/ml. (30)

6. RESULTADOS

De los 100 sueros analizados, 6 resultaron positivos a IDGA y 22 a RSAT. Los sueros positivos a ésta última fueron nuevamente testeados, con la adición de 2 –ME 0.2 M, para aumentar la especificidad; el resultado fue de 7 positivos.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro VI. Se puede observar que 5 fueron positivos a las 3 técnicas, 1 a IDGA, 15 a RSAT, 2 a RSAT y 2ME-RSAT y 77 negativos a IDGA y RSAT.

CUADRO VI: RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS

5	+	+	+
1	+	-	-
15	-	+	-
2	-	+	+
77	-	-	

CUADRO VII: DATOS DE LOS 5 CANINOS QUE RESULTARON SER POSITIVOS A LAS 3 TÉCNICAS.

3 G	H	Pekinés	12 años	No presenta	Blanqueada
15 G	H	Cruza	8 años	No presenta	Blanqueada
0040/06	H	Cruza	3 años	No presenta	Unión
8 J	M	Ov. alemán	5 años	No presenta	Casavalle
18 J	H	Rottweiler	9 años	Aborto, lumbalgia	Casavalle

Para la comparación entre las pruebas se utilizó el test de kappa como medida de concordancia, con un nivel de confianza del 95%.

Para IDGA y RSAT el índice kappa fue de 0.29 y para IDGA y 2ME-RSAT de 0.77, correspondiéndose a una débil y buena concordancia respectivamente.

7. DISCUSIÓN

El diagnóstico de la brucelosis canina se realiza generalmente a través de pruebas serológicas, siendo las más usadas las de aglutinación y precipitación.

En nuestro trabajo, el 22% de los sueros resultaron ser positivos a RSAT, y con la adición del 2-2-ME el porcentaje de positivos se redujo al 7%. Esto se puede atribuir a la acción que tiene el ME sobre las IgM que aumenta la especificidad de la técnica, verificándose lo citado en la bibliografía consultada.

De los 6 positivos a IDGA, 5 también lo fueron para RSAT y 2ME-RSAT.

Hubieron 2 sueros que fueron positivos a ambas técnicas de aglutinación pero negativas en la IDGA, este resultado puede deberse a una infección temprana, ya que las primeras detectan los títulos de anticuerpos unas semanas antes. También, junto con el suero que resultó ser positivo únicamente a la IDGA, podría deberse a errores preanalíticos, analíticos o de interpretación de los resultados.

Con respecto a los cinco caninos positivos a las tres técnicas, podríamos presumir que no existe predilección de raza, sexo ni edad, siendo el tipo de manejo el único factor incidente; coincidiendo con el trabajo de De Azevedo y col. (15) Cabe destacar que si bien cuatro eran hembras, el 68% del total de los sueros analizados correspondían a este sexo.

En cuanto a las características de las técnicas empleadas, la RSAT tiene como ventaja que es sencilla, rápida (la lectura del resultado se hace al cabo de 2 minutos) y económica, pero tiene el inconveniente de que hasta un 60% de los resultados son falsos positivos y que requiere experiencia del operador a la hora de interpretar los resultados.

Creemos que es necesario realizar la 2 ME-RSAT (M-), ya que permite obtener una mayor especificidad sin disminuir la sensibilidad.

En contrapartida, la IDGA es más laboriosa y se requieren de 48 hs para leer los resultados, pero a nuestro entender su lectura es más sencilla.

8. CONCLUSIÓN

Por ser la brucelosis canina una enfermedad insidiosa y con signos clínicos poco sugestivos de la enfermedad, se hace necesario recurrir al laboratorio para llegar a un diagnóstico definitivo. Si bien el aislamiento bacteriano es el método ideal, es un procedimiento que demanda tiempo. También resulta impráctico para la evaluación rutinaria de los animales asintomáticos y dado que la bacteriemia es intermitente, su interpretación debe ser cautelosa ya que un cultivo negativo no descarta totalmente la infección. Por esta razón, el análisis serológico suele utilizarse como procedimiento diagnóstico selectivo para la brucelosis canina.

En base a nuestros resultados podemos concluir:

- La RSAT es una técnica muy sensible, pudiendo ser utilizada para la evaluación rutinaria de los animales asintomáticos, es decir, como técnica de screening. Si transcurre el tiempo suficiente para la producción de anticuerpos, si el animal no tiene infección crónica para que declinen los títulos y si no se administraron antibióticos, los caninos libres de brucelosis deberían identificarse con este análisis.
- Existe una buena concordancia entre IDGA y 2ME-RSAT (M-). La primera es la técnica de elección para el diagnóstico de la brucelosis canina en nuestro país, por lo tanto creemos que la ME-RSAT podría comenzar a implementarse en nuestros laboratorios al ser más rápida, económica y sencilla.
- Los test de aglutinación son muy sensibles, un resultado negativo no es necesario a priori que sea confirmado. Por el contrario, todo resultado positivo o dudoso, debe ser confirmado por otro test más específico tal como ELISA indirecto, IDGA utilizando antígenos citoplasmáticos o por aislamiento bacteriano.

Por todo lo expuesto, sugerimos que en los lugares donde se concentran canes (criaderos, pensionados, exposiciones, etc.), se exija certificado "libre de brucelosis canina".

También queremos alertar a los veterinarios sobre la existencia de esta enfermedad pocas veces considerada, y que puede resultar muy grave dado su cronicidad, falta de una terapia realmente efectiva así como también la falta de vacunas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida AC, Santorelli A, Bruzadelli RMZ, Oliveira MMNF. (2004). Soroepidemiología da brucelose canina causada por *Brucella canis* e *Brucella abortus* na cidade de Alfenas, MG. *Arq Bras Med Vet Zootec*; 56:275-276.
2. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. (1976). Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2ª ed., Ginebra, OMS, 169 p.
3. Bermúdez J, Piquet M, Cattáneo M. (2005). Preparación del antígeno M- *Brucella canis* para la prueba de RSAT. Montevideo, Facultad de Veterinaria, Departamento Ciencias Microbiológicas, Área Bacteriología, 5 p.
4. Borie C. (2004). Infertilidad canina por *Brucella canis*. En: Gobello C. Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos. Bs As, Ed. Gráfica Latina, pp 43-54.
5. 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.
6. Briseño González H, Páramo Ramírez RM, Flores Castro R, Suárez Güemes F. (2004). Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Vet Méx*; 35:121-128.
7. Carmichael LE, Greene CE. (1993). Brucelosis canina. En: Greene CE. Enfermedades infecciosas: perros y gatos. México, Ed. Interamericana, pp.604-616.
8. Carmichael LE. (1990). Brucelosis canina causada por *B. canis*: enfermedad clínica; problemas en inmunodiagnóstico. *Rev Med Vet (Bs As)*; 80:102-106.

9. Carmichael LE, Joubert JC. (1987). A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet*; 77:3-12.

10. Carmichel LE. (1966). Abortions in 200 Beagles. *JAVMA*; 149: 1126.

11. Centro Panamericano de zoonosis. (1976). Brucelosis. Técnica de difusión en gel de agar para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros. Nota Técnica N° 20. Bs As, OPS, 15 p.

12. Cicuta ME, Miranda AO (1990). Primer aislamiento de *Brucella canis* en la ciudad de Corrientes, Argentina. *Vet Arg*; 7:463-465.

13. De Aguiar DM, Cavalcante GT, Vasconcellos SA, Megid J, Salgado VR, Cruz TF, Labruna MB, Pinter A, Ramos da Silva JC, Moraes ZM, Camargo LMA, Gennari SM. (2005). Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*; 35:1216-1219.

14. De Azevedo SS, Vasconcellos SA, Keid LB, Grasso LMPS, Pinheiro SR, Mascoll R, Alves CJ. (2004). Comparação de três testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. *Braz J Vet Res Anim Sci*; 41:106-112.

15. De Azevedo SS, Vasconcellos SA, Alves CJ, Keid LB, Grasso LMPS, Mascoll R, Pinheiro SR. (2003). Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. *Pesq Vet Bras*; 23:156-160.

16. Del Amo A, Venturini MC, Di Lorenzo C, Mórtoia E, Ruager J. (1994). Brucelosis en un canino macho. *Vet Arg*; 11:28-30.

17. Dunne J, Sehgal K, McMillan A, Perret L. (2002). Canine brucellosis in a dog imported into the UK. *Vet Rec*; 151:247.
18. Flores-Castro R, Carmichael LE. (1978). Canine brucellosis. Current status of methods for diagnosis. *Cornell Vet*; 7:76-88.
19. Gous TA, Janse van Rensburg WJ, Gray M, Perrett LL, Brew SD, Young EJ, Whatmore AM, Gers S, Picard J. (2005). *Brucella canis* in South Africa. *Vet Rec*; 157:668.
20. Greene CE. (1997). Enfermedades bacterianas. En: Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado de Medicina interna veterinaria: Enfermedades del perro y el gato*. 4ª ed., Bs As, Ed. Inter-Médica, pp.449-460.
21. Iribarren F, Breglia J, Castillo M, Escobar V, Hoffman F. (1999). Comparación de las pruebas de Inmunodifusión del gel de agar con antígeno de *Brucella ovis* y de aglutinación en placa con *Brucella canis* M (-) para el diagnóstico de la brucelosis canina. *Vet Arg*; 16:146-150.
22. Johnson CA. (2000). Infecciones genitales y tumor venéreo transmisible. En: Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna de animales pequeños*. 2ª ed., Bs As, Ed. Inter-Médica, pp.988-995.
23. Johnson CA. (1997). Tratamiento de brotes de *Brucella canis* en perreras de reproducción. En: Kirk RW, Bonagura JD. *Terapéutica veterinaria de pequeños animales*. 12ª ed., México, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, pp.1177-1181.
24. Jones RL, Emerson JK. (1984). Canine brucellosis in a commercial breeding kennel. *JAVMA*; 184:834-835.
25. Kerwin SC, Lewis DD, Hribernik TN, Partington B, Hosgood G, Eilts BE. (1992). Diskospondylitis associated with *Brucella canis* in dogs: 14 cases (1980-1991). *JAVMA*; 201:1253-1257.

26. Léone AC. (2000). La Brucellose canine à *Brucella canis*: une maladie protéiforme. These Ec Nat Vet Toulouse, N° 4067, 128p.
27. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G. (2002). Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol*; 51:656-660.
28. Martino P, Carballo J, Malet A, Taroco J. (1983). Brucelosis canina: Estudio serológico de una población. Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria (1ª). Montevideo, Uruguay, pags 38-39.
29. Robles CA. (1998). Evaluación de una técnica de doble difusión en gel de agar para el diagnóstico de la infección por *Brucella ovis* en carneros. *Vet Arg*; 15:119-124.
30. Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección Laboratorios Veterinarios "MC Rubino". (1995). Doble difusión en gel agar para el diagnóstico de *Brucella ovis*. DILAVE, 10p.
31. Van Duijkeren E. (1992). Significance of the vaginal bacterial flora in the bitch: a review. *Vet Rec*; 131:367-369.
32. Vinayak A, Greene CE, Moore PA, Powell-Johnson G. (2004). Clinical resolution of *Brucella canis*- induced ocular inflammation in a dog. *JAVMA*; 224:1804-1807.
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.
34. Wanke MM, Monachesi NE, Loza ME, Rutter B, Baldi PC, Fossati CA. (2000). Determinación de anticuerpos contra proteínas citoplasmáticas de *Brucella* por Elisa para la detección de casos crónicos de brucelosis canina. *Selec Vet*; 8:308-311.