

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Brucella canis* EN PERROS DEL
BARRIO HORACIO QUIROGA DE SALTO**

por

Fernando ARISTEGUI



TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental



**MONTEVIDEO
URUGUAY
2011**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:



Dr. Pedro Martino

Segundo Miembro:
(Tutor)



Dr. Julián Bermúdez

Tercer Miembro:



Dr. Luis Carretto

Cuarto Miembro:
(Co-tutor)

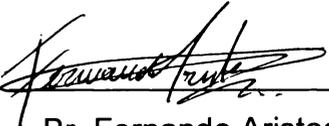


Br. Milton Cattáneo

Fecha:

13 de Octubre del 2011

Autor:



Br. Fernando Aristegui

29206

I

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Aprobado: 10 (diez) 

AGRADECIMIENTOS

Desearía agradecer a las siguientes personas que tanto directa como indirectamente, permitieron que este trabajo se llevara a cabo.

En primer lugar a mi Familia, por haberme apoyado durante toda la carrera.

A mi novia Alejandra, por estar siempre a mi lado y ayudarme en la tarea de campo.

A familia Pérez Martínez, y al Barrio Horacio Quiroga del Departamento de Salto, por estar a nuestra disposición en todo momento.

Al Br. Milton Cattaneo y al Dr. Julián Bermúdez quienes aceptaron desde un primer momento la propuesta.

Al Dr. Gustavo de Souza por haberme ayudado en la búsqueda de material bibliográfico.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS



Tabla N°1: DIFERENCIACIÓN DE <i>BRUCELLA</i> EN BIOTIPO.....	Página 6
Tabla N°2: ACCIDENTES GENITALES OBSERVADOS LUEGO DE LA INFECCIÓN POR <i>B. canis</i>	Página 20
Tabla N°3: CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>B. canis</i>	Página 23
Tabla N°4: COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS SEROLÓGICOS PARA BRUCELOSIS CANINA.....	Página 26
Tabla N°5: DATOS DEL CENSO.....	Página 37
Tabla N°6: DISCRIMINACIÓN ENTRE ENTERO Y CASTRADO POR SEXO.....	Página 38
Tabla N°7: DISCRIMINACIÓN POR EDAD.....	Página 38
Tabla N°8: DATOS DE ANIMALES SANGRADOS.....	Página 38
Tabla N° 9: RESULTADOS DE LA TÉCNICA RSAT-2ME.....	Página 40
Figura N°1: ESTRUCTURA DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS) DE <i>BRUCELLA</i>	Página 9
Figura N°2: PATOGENIA SECUENCIAL DE LA BRUCELOSIS CANINA...	Página 17
Figura N°3: FRECUENCIA DE ABORTOS EN FUNCIÓN DEL ESTADO DE GESTACIÓN.....	Página 19
Figura N°4: IMAGEN SATELITAL DE LA CIUDAD DE SALTO.....	Página 31
Figura N°5: PLANO DEL B° HORACIO QUIROGA.....	Página 31

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	III
1- RESUMEN.....	1
2- SUMMARY.....	2
3- INTRODUCCIÓN.....	3
4- REVISIÓN BOBLIOGRÁFICA.....	5
4.1- General.....	5
4.1.1- Historia.....	5
4.1.2- Clasificación.....	7
4.1.3- Etiología, Morfología y Desarrollo.....	7
4.1.4- Bioquímica.....	8
4.1.5- Ultraestructura.....	8
4.1.6- Epidemiología.....	10
4.1.7- Estructuras antigénicas y toxinas.....	10
4.1.8- Respuesta Inmune.....	11
4.1.9- Patogenia.....	12
4.1.10- Descontaminación.....	12
4.1.11- Salud Pública.....	13
4.2- <i>Brucella canis</i>	13
4.2.1- Etiología.....	13
4.2.1.1- <i>B. canis</i> , cepa salvaje.....	14
4.2.1.2- Variante M- de <i>B. canis</i>	14
4.2.2- Epidemiología.....	14
4.2.3- Patogenia.....	16
4.2.4- Signos Clínicos.....	18
4.2.5- Datos del laboratorio clínico.....	20
4.2.6- Espermiograma.....	20
4.2.7- Diagnóstico.....	21
4.2.7.1-Aislamiento Bacteriano.....	21

4.2.7.2- Pruebas Serológicas.....	23
4.2.8- Diagnóstico Diferencial.....	27
4.2.9- Lesiones Histológicas.....	27
4.2.10- Inmunidad Vacunal.....	28
4.2.11- Control y Prevención.....	28
4.2.12- Terapéutica.....	29
4.2.13- Salud Pública.....	29
5- OBJETIVOS.....	30
6- HIPÓTESIS.....	30
7- MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7.1- Censo y Muestra Sanguínea.....	32
7.2- Elaboración del Antígeno.....	33
7.3- Ejecución de la técnica RSAT-2ME.....	35
8- RESULTADOS.....	36
8.1- Censo y muestra sanguínea.....	36
8.2- Antígeno.....	39
8.3- Estudio de los sueros problemas por la Técnica RSAT-2ME.....	39
9- DISCUSIÓN.....	41
10- CONCLUSIÓN.....	42
11- BIBLIOGRAFÍA.....	43

1- RESUMEN

La brucelosis canina causada por *Brucella canis*, es una de las enfermedades infecciosas de los cánidos que viene aumentando a nivel mundial. Afecta tanto a animales domésticos como cánidos salvajes (zorros, coyotes, etc.), no presentando predilección por raza, sexo o edad. En la hembra provoca aborto, o nacimiento de cachorros muertos, mientras que en el macho provoca infertilidad. La mayoría de los casos de brucelosis causada por dicho microorganismo se ha constatado en criaderos de perros, aunque también lo han encontrado en perros callejeros. El objetivo principal del trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos anti-*Brucella canis* en el suero de perros del Barrio Horacio Quiroga de la ciudad de Salto mediante la técnica RSAT-2ME; realizar además el censo canino del barrio, elaborar el Antígeno, y crear un banco de sueros para futuras investigaciones. El resultado principal del trabajo dio negativo a la presencia de Acs mediante la técnica utilizada. Desde el punto de vista epidemiológico, en el barrio hay 1,8 perros por hogar. Debido a los resultados obtenidos, se puede concluir que en el barrio no hay presencia de perros con serología positiva a *Br. canis*. Para posteriores estudios del barrio, se mantienen los sueros a -80°C.

2- SUMMARY

Canine brucellosis caused by *Brucella canis*, is one of canids infectious diseases what is increasing worldwide. It affects domestic animals much as savage canids (foxes, coyotes, etc.), without predilection of race, sex or age. In females cause misbirth or dead birth puppies, while in males cause infertility. The most cases of brucellosis caused by this organism has been found in breeding dogs, although they also found in wild dogs. The main work objective was to determinate the anti-*Brucella canis* antibodies in dog`s serum in Horacio Quiroga neighborhood, in the city of Salto, by RSAT-2ME technique, perform canine census of the neighborhood, elaborate the antigen, and create a serum bank for future research. The main result of the work gave negative for presence of ACS, through the used technique. From the epidemiological point of view, there are 1.8 dogs per household in the neighborhood. Due to the results obtained, it can be possible to conclude that in the neighborhood, there is no presence of dogs with positive serum of *Br. canis*. For future neighborhood studies, have serums at -80 ° C.

3- INTRODUCCIÓN

El cánido desde tiempos remotos ha convivido en compañía del hombre, siendo por ende la primera especie animal en ser domesticada.

La continua selección de ejemplares con características buscadas por el humano, llevó al surgimiento de muchas especies de perros, que hoy en día se diferencian tanto morfológica como funcionalmente.

En la actualidad, como hace miles de años, el perro es una ayuda para la búsqueda de alimento, para el trabajo, cumple el rol de guardián, de guía, etc., pero sobre todo, el perro es un compañero.

Todo esto y mucho más, han llevado que el hombre siempre se interesara por tenerlo a su lado, y es así, que comienza a haber un contacto más estrecho entre ambos, lo que lleva a que ese compañero en muchos casos pase a ser un miembro más de la familia.

La moda desde hace unas décadas, y principalmente en los países desarrollados, llevó a que la gente se interesara por animales de pedigrí, lo que llevó al aumento del número de criaderos de perros de raza, y por consiguiente a un mayor interés sobre el conocimiento de las enfermedades reproductivas de los mismos.

El siguiente trabajo trata de la brucelosis canina, que es una enfermedad infecto-contagiosa de los caninos, causada por una bacteria denominada *Brucella canis* (*B. canis*).

Fue diagnosticada en 1966 por Carmichael en EEUU, durante investigaciones sobre brotes de abortos y partos fallidos en perras de raza Beagle de un criadero. (13).

Es una enfermedad causante de aborto en perras e infertilidad en machos, de importancia económica ya que ha llevado a causar grandes pérdidas en criaderos y de interés para salud pública al ser una *zoonosis*.

En el año 1968 el microorganismo aislado, fue caracterizado por Carmichael y Bruner como *Brucella canis*, y más tarde el subcomité de taxonomía del género *Brucella* aceptó a la misma como una especie provisional del género debido a sus características bioquímicas y a la homología de su ADN.

Al contrario que las *Brucella* en fase lisa (*B. Abortus*, *B. Melitensis*, *B. Suis*) que pueden infectar varias especies de animales diferentes, *B. canis* tiene un margen de huéspedes reducido, afectando solo a perros y cánidos salvajes (coyotes, zorros) en condiciones naturales. No tiene predilección de raza, sexo, ni de edad, afectando a

cualquier ejemplar.

La infección varía según la edad del animal, su situación geográfica y condiciones de alojamiento. Los perros callejeros en zonas de bajos recursos tienen una mayor probabilidad de contraer la enfermedad debido a la falta de control de su procreación y su alta densidad demográfica. (31, 55)

Esta enfermedad es una zoonosis de baja intensidad. Los síntomas clínicos en el humano son fiebre, cefaleas, escalofríos, pérdida de peso, linfadenopatía, faringitis y malestar general, presentando como complicaciones raras: endocarditis, hepatitis, meningitis y artritis. El diagnóstico se realiza en forma clínica y se confirma por medio del laboratorio.

La enfermedad tiene distribución mundial y una prevalencia variable dependiendo de cada región. En EEUU la prevalencia varía de 1 a 19 %, en México la tasa de infección es de 28%, fue identificada en países europeos como Alemania, España, Gran Bretaña, Italia siendo la prevalencia de 4.5 a 6.5 %,

También existe en Argentina, Brasil, Canadá, y Perú. Chile con un 30.5%. En Nigeria la sero-prevalencia es de 28,6 %, en Japón de 2.9 %, India de 2.18 %, siendo reconocido también en Madagascar y Túnez. (2, 28, 32, 52, 54)

En Uruguay existen tres trabajos sobre la enfermedad, los cuales fueron publicados en los años 1983, 2006 y 2007, dando una prevalencia de 0.017, 5 y 1.46 por ciento respectivamente. (5, 22, 45)

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. (31, 55)

4- REVISION BIBLIOGRÁFICA



4.1- General

4.1.1- Historia

En el año 1887 David Bruce aísla un microorganismo (m. o.) a partir del bazo de un hombre muerto por fiebre de Malta, pasando a ser la primera especie del género *Brucella* descubierta. Posteriormente la bacteria se denomina *B. melitensis*. Más adelante, Horrocks y Zammit demuestran el poder patogénico del m. o. en la cabra; agregando investigaciones acerca de la presencia de la bacteria en la leche de la misma, concluyendo la tríada epidemiológica, detectando la fuente de contagio para el hombre, y demostrando así el carácter zoonótico de la enfermedad. En Dinamarca, diez años más tarde del primer aislamiento de *Brucella* (1897), Bernard Bang y Stribolt aíslan *Bacillus abortus* en una vaca que había abortado, al que denominan luego *Brucella abortus*; y Schroeder y Cotton en 1911 detectan el mismo agente en la leche de varias vacas infectadas. Jacob Traum en el año 1914, investiga fetos porcinos abortados y aísla otro m. o. similar a los anteriores, el cual se denomina *B. suis*. Posteriormente, se aíslan otras especies como *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. canis*.

Hasta la actualidad, el género *Brucella* se integra por seis especies, y a su vez, algunas de estas presentan biotipos: *B. abortus* con 8 biotipos; *B. melitensis* con 3 biotipos; *B. suis* con 5 biotipos y *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. canis*. Además se ha propuesto la incorporación al género de las dos especies de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos (*B. cetaceae*, *B. pinnipediae*).

La diferenciación de las especies se basa en el espectro de hospedadores preferenciales, en la sensibilidad a los bacteriófagos y en el metabolismo de determinados aminoácidos, carbohidratos y metabolitos del ciclo de la urea. Los fagos específicos para *Brucella* que se utilizan en un esquema simple de tipificación son: Tbilisi (Tb), Izatnagar (Iz), Weybridge (Wb) y R/C.

Las *Brucella* que presentan biotipos son las especies en fase S (lisa), y éstas demuestran rasgos epidemiológicos diferentes entre sí. Bioquímicamente, varían por sus requerimientos de CO₂ para crecer, por la producción de H₂S, según su crecimiento en presencia de colorantes inhibidores (tionina y fucsina básica), y por

su aglutinabilidad por sueros monoespecíficos anti-A, anti-M (antígenos asociados al polisacárido O) y anti-R.

Epidemiológicamente, cada especie de *Brucella* tiene su hospedero natural, pero en algunos casos el mismo m. o. puede afectar a más de un hospedero accidentalmente, al igual que un mismo hospedero puede ser afectado por más de una especie de *Brucella*. Los hospederos naturales que se conocen son: la cabra; el ganado bovino, el cerdo, los ovinos y los cánidos, siendo *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. canis* respectivamente las especies que las afectan. Cada *Brucella* se propaga fácilmente entre los individuos de la especie normalmente hospedadora, con tendencia a persistir indefinidamente en las masas de animales.

Tabla N°1. Diferenciación de *Brucella* en biotipos

Especie	Biotipo	CO2	H2S	Tion	Fuc	A	M	R
<i>Brucella melitensis</i>	1		-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>Brucella abortus</i>	1	-	+	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	-	+	-	+	-
	5	+	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
<i>Brucella suis</i>	9	-	+	+	+	-	+	-
	1	+0-	-	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	+	+	-
<i>Brucella neotomae</i>	5	-	-	+	-	-	+	-
		-	+	-	-	+	-	-
<i>Brucella ovis</i>		+	-	+	-	-	-	+
<i>Brucella canis</i>		-	-	+	-	-	-	+
<i>Brucella maris</i>		+0-	-	+	+	+	-	-

CO2: requerimiento de dióxido de carbono para desarrollo; H2S: producción de ácido sulfhídrico; Tion: crecimiento en presencia de tionina (20 mg/ml); Fuc: crecimiento en presencia de fucsina básica (20 mg/ml); A, M Y R: aglutinación frente a sueros monoespecíficos hiperinmunes de conejo anti antígenos A, M y cepas rugosas, respectivamente.

Stanchi N.O.

4.1.2- Clasificación

El género *Brucella* pertenece al phylum de las Proteobacterias, dentro de la clase α -proteobacterias, clasificación que se basa en el análisis de la secuencia del RNA ribosomal 16S. Este grupo comprende el mayor número de bacterias y más diverso metabólicamente de todos. La totalidad de los individuos de dicho grupo son gramnegativos, y muestran una enorme diversidad de mecanismos de generación de energía, incluyendo especies quimiolitótrofas, quimiorganótrofas y fotótrofas. También presentan diversidad fisiológica (anaerobias, aerobias y microaerófilas), al igual que morfológicamente, presentando bacilos, cocos, curvas, entre otros. Este taxón agrupa patógenos de humanos o animales como *Rickettsia*, *Bartonella*, *Ochrobactrum* y *Anaplasma*, y algunos no patógenos.

4.1.3- Etiología, Morfología y Desarrollo

Las bacterias del género *Brucella* son células cortas, Gram negativas, de forma que varía desde cocoide a bacilar, con un tamaño de 0,5-0,7 μm x 0,6-1,5 μm . En general aparecen aisladas, pero pueden presentarse en pares o pequeños grupos. Son inmóviles, sin cápsula y no esporuladas, con una afinidad especial por los colorantes alcalinos. En la coloración empleada sobre frotis para su observación, como la de Stamp (Ziehl-Neelsen modificado), aparecen como acidorresistentes. Crecen en aerobiosis, pero en el primer aislamiento algunas cepas de *B. abortus* y *B. ovis* necesitan una atmósfera de CO₂ incrementada (5-10%). Requieren de biotina, tiamina y nicotinamida, elementos que se encuentran en los medios habituales de cultivo. Algunas especies y biotipos se desarrollan mejor si el medio se enriquece con 5-10 % de suero. No se desarrollan en medios selectivos con sales biliares, telurito o selenito.

Si se compara con las enterobacterias, el desarrollo en medios de cultivos es relativamente lento.

En medio de cultivo líquido, desarrollan pobremente; observando que las cepas en fase lisa enturbian tenuemente el medio, produciendo un sedimento muy fino, mientras que las cepas en fase rugosa pueden formar una película en superficie, el sedimento es más granular y la turbidez variable.

En medios de cultivo sólidos, no se observan colonias hasta pasados por lo menos 3 días de incubación. Si se observa a trasluz la placa sembrada, las colonias aparecen redondas, pequeñas (1-2 mm), de bordes enteros, translúcidas y de un color miel pálido. Observadas desde arriba, su color aparece blanco marfil o perlado, y de superficie convexa.

No todas las especies de *Brucella* presentan la misma velocidad de crecimiento in vitro, por ejemplo, *B. canis* y los biotipos 1 y 3 de *B. suis* desarrollan relativamente más rápido en comparación con *B. melitensis*.

Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento, necesitan alrededor de 37°C, perteneciendo al grupo de los mesófilos, al igual que la mayoría de las bacterias patógenas.

4.1.4- Bioquímica

Poseen metabolismo del tipo oxidativo, y pueden utilizar los nitritos como aceptor de electrones. En general no son fermentadores de azúcares. No utilizan el citrato como única fuente hidrocarbonada. Son catalasa negativa y generalmente también oxidasa negativa. No producen indol, la actividad ureasa es variable, no atacan la gelatina ni modifican la leche.

4.1.5- Ultraestructura

Como se menciona anteriormente, las bacterias del género *Brucella* son Gram negativa, esto implica que su envoltura celular compleja posee elementos que la diferencia morfológicamente y funcionalmente a las Gram positivas. Dicha cubierta está formada por: una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio. Este espacio contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos, además de un gel glucopeptídico denominado peptidoglucano. La membrana externa contiene fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS) considerado el principal antígeno.

Se va a poner especial hincapié en los **LPS**, ya que éstos son los responsables, según la expresión o no en la superficie de la membrana externa de la *Brucella*, la clasificación entre cepas “lisas” (“smooth”, S) o “rugosas” (“rough”, R).

Se distinguen tres regiones que se diferencian desde el punto de vista genético, químico y biológico. Estas zonas son: el **lípidio A**, que se inserta profundamente en la hoja externa de la membrana externa; un **oligosacárido** intermedio, llamado núcleo, y el **polisacárido O** (PSO), conocido también como cadena u antígeno O.

Debido a la cadena O, se conocen dos tipos principales de LPS: el LPS-S y el LPS-R. La diferencia en la composición química entre los dos es la presencia de PSO solo en el primero.

Los antígenos A y M, definidos en 1932 por Wilson y Miles por pruebas de adsorción cruzada, como los antígenos dominantes en *B. abortus* y *B. melitensis*, son estructuras presentes en el PSO del LPS-S de *Brucella*. Las cepas de *Brucella* en fase lisa presentan reactividad antigénica cruzada con otras bacterias Gram negativas. Esa comunidad antigénica se debe a la similitud de las cadenas de PSO.

Desde el punto de vista genético, *Brucella* no posee plásmidos ni mecanismos de conjugación, sin embargo, se ha encontrado en diferentes especies y biotipos que el genoma de estos microorganismos está distribuido en dos cromosomas independientes (replicones), de tamaño diferente.

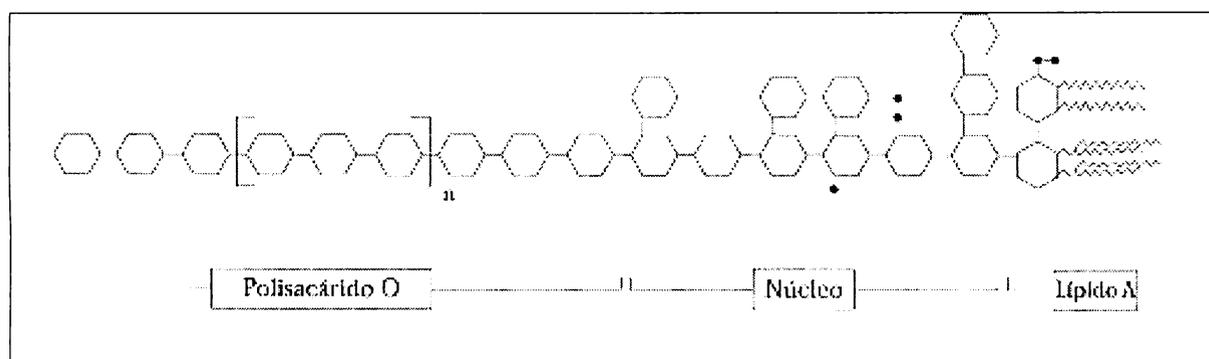


Fig. Nº1. Estructura del Lipopolisacárido (LPS) de *Brucella*. **J. Bacteriol.**

4.1.6- Epidemiología

Con respecto a la tríada epidemiológica de las *Brucella*, se menciona superficialmente lo respectivo al género, ya que se profundiza más adelante lo relacionado a la especie *B. canis*, de cual se trata el trabajo.

Los microorganismos ingresan al hospedero mediante vía oral, conjuntival, vaginal, u otra mucosa, dependiendo la especie de *Brucella* que esté actuando. Ya se menciona anteriormente las especies de *Brucella* y sus hospederos naturales. Las bacterias pasan del organismo al medio, principalmente por fetos y membranas fetales abortadas, semen o líquido seminal (carneros vasectomizados), y en menor medida a través de secreciones vaginales.

Se han reportado cifras tan altas como 10^{14} UFC de *Brucella* por gramo de tejido cotiledonario de vacas.

Teniendo en cuenta que es una bacteria no esporulada, en el ambiente sobrevive por períodos relativamente largos. Por ejemplo, en el suelo húmedo y el estiércol usado como abono, se registran tiempos de sobrevivencia de hasta 80 días, y en el polvo entre 15 y 40 días.

4.1.7- Estructuras antigénicas y toxinas

La variación del tipo liso o rugoso está determinada por la presencia de la cadena O en el LPS del primero, lo que determina una modificación en la estructura antigénica. Para el género *Brucella* no se ha demostrado la producción de exotoxinas.

Por más que las cepas salvajes de *Brucella* carecen de cápsula celular, Gonzales mediante pases sucesivos e inyectando almidón y mucina a colonias de *B. melitensis* y *B. abortus*, ha demostrado la relación entre el material capsular y la virulencia, consiguiendo aumentarla para los ratones. Los cultivos altamente virulentos producidos por este procedimiento, eran capsulados.

La capacidad de las bacterias Gram negativas para producir una reacción inflamatoria en los tejidos de los animales hospedadores se considera por lo general debido a una endotoxina.

4.1.8- Respuesta Inmune

Para el diagnóstico serológico de brucelosis en las especies domésticas, la mayoría de las pruebas empleadas, utilizan bacterias enteras o antígenos enriquecidos en componentes de la membrana externa, por ende, estas técnicas detectan fundamentalmente anticuerpos anti-LPS.

Luego de la inoculación con *Brucella*, tras un primer contacto, la serología se vuelve positiva a la primera o segunda semana, con un predominio durante las primeras 2 semanas de anticuerpos IgM. La respuesta a IgG comienza también tempranamente, antes que la IgM llegue a su pico, y puede alcanzar su máximo entre la tercera semana y el mes. (53)

Tras una exposición a cepas virulentas, la respuesta serológica se mantiene luego de 4-10 semanas (e incluso más). La infección crónica se caracteriza en el bovino por la síntesis prolongada de IgG1.

Por más que la mayoría de las técnicas de diagnóstico identifiquen Ac anti-LPS, los demás componentes de la bacteria generan también respuesta inmune, pero por lo general, las respuestas de Ac anti-proteínas son menos vigorosas que las anti-LPS y aparecen más tardíamente que estas últimas en el transcurso de la infección. Mientras los niveles de IgM anti-LPS pueden ser muy elevados, los de IgM antiproteínas son generalmente bajos.

Debemos de tener en cuenta la respuesta inmune celular inducida por este microorganismo, ya que son capaces de establecer una infección intracelular persistente.

Los animales vacunados o infectados por cepas virulentas desarrollan una reacción de hipersensibilidad de tipo IV (mediada por células) cuando son inyectados intradérmicamente con extracto de *Brucella*. (53)

4.1.9- Patogenia

Después de atravesar la barrera protectora de la piel o de las mucosas, los m.o. llegan a los ganglios linfáticos regionales, donde son fagocitados por los macrófagos y por los PMN.

La persistencia intracelular de las bacterias del género *Brucella* se da por la protección contra la digestión celular, debido a una sustancia hidrosoluble y éter-soluble existente en la pared bacteriana, que es capaz de inhibir la fusión del fagosoma con los lisosomas. De este modo son capaces de sobrevivir y multiplicarse.

En la fase de difusión, los m.o. se diseminan por todo el organismo a través de la corriente sanguínea, llegando al bazo, hígado y médula ósea, siendo estos los órganos blancos.

Al salir de las células infectadas, se produce la destrucción de las mismas, y con esto la liberación de endotoxinas pirógenas, productos metabólicos y restos de células que generalmente causan fiebre.

Las *Brucella* pueden permanecer en las células durante años, incluso durante toda la vida, y es posible que causen infecciones recidivantes. El sistema reticuloendotelial del hígado y del bazo reacciona a la infección crónica mediante formación de un granuloma de células epiteliales, que se puede necrosar y calcificar. La pérdida de los Ag A y M de las formas lisas habituales causa una disminución de la virulencia.

4.1.10- Descontaminación

Las bacterias de este género son termolábiles, por lo cual la pasteurización constituye un método eficaz para sanear alimentos. Por ser sensibles a la acidificación, la carne se descontamina espontáneamente durante su maduración. Para tratar superficies se las puede bañar durante 1 hora con soda caustica (2-3%), formaldehído (2%) o hipoclorito de calcio (2,5%), además de fenol y amonios cuaternarios.

4.1.11- Salud Pública

La brucelosis en el hombre es accidental, ya que el mismo no es hospedero natural de ninguna especie de *Brucella*. En este caso, la enfermedad es un reflejo de la situación en los animales.

Epidemiológicamente se pueden distinguir dos situaciones: por un lado se encuentra la población en general, en la cual la infección sobreviene habitualmente por consumo de productos lácteos contaminados, siendo los quesos frescos los de mayor riesgo, en especial los de ovejas y cabras (*B. melitensis*). Por otro lado se presenta la población de alto riesgo, en la que la infección se produce por estrecho contacto con el animal infectado, siendo el caso de los veterinarios, criadores, empleados de mataderos y laboratoristas.

Para el hombre la más patógena es *B. melitensis*, seguida de *B. suis*, *B. abortus* y por último *B. canis*.

La duración del período de incubación es variable, dependiendo de la especie y del curso de la infección. En el caso de *B. melitensis* la duración estimada del periodo de incubación es de 14+- 6 días. Para *B. abortus* y *B. suis* pueden tener una duración que varía entre varias semanas y meses.

4.2- *Brucella canis*

4.2.1- Etiología

Brucella canis es una bacteria coco bacilar pequeña, con un tamaño que oscila entre 1 y 1,5 micras. Es aerobia y Gram negativa frente a la coloración de Gram. A diferencia de otras del mismo género, se inhibe con 10% de CO₂. (14, 31, 35, 49)

La morfología rugosa de sus colonias y las diferencias en las reacciones bioquímicas la distinguen de otras especies de su mismo género.

4.2.1.1- *B. canis*, cepa salvaje

Dos años posteriores al primer aislamiento de *B. canis* (1968), Carmichael y Bruner publican los resultados de un estudio bacteriológico sobre la bacteria.

La cepa de referencia fue designada por la sigla RM 6/66, la cual fue aislada de fluidos alantoideos y diferentes órganos (riñón, pulmón e hígado) de abortos de perras Beagle. (41)

4.2.1.2- Variante M- de *B. canis*

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

Esta variante es mucho menos mucoide que la cepa salvaje, y se designa por la sigla SM por suave mucoide o M-. (41)

La variante M- posee los mismos Ag que la cepa salvaje.

B. canis M- es muy poco patógena en relación a la cepa salvaje, considerando que no provoca aborto, los cachorros nacidos de madres infectadas son sanos y no produce epididimitis en el macho.

4.2.2- Epidemiología

A diferencia de las *Brucella* de colonias lisas, que tienen un amplio margen de animales susceptibles, *B. canis* solamente infectan en forma natural a un número limitado de especies, siendo susceptibles los perros (*Canis familiaris*) y los cánidos salvajes. Se han observado además infecciones en gatos, conejos y humanos, aunque en la mayoría de los casos la infecciones fueron experimentales.

Los perros domésticos también son susceptibles a infecciones por *Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella melitensis*, se piensa que en todos los casos pueden estar dado por la ingestión de placenta o fetos abortados como consecuencia de la enfermedad. Aunque son susceptibles, no se cree que puedan diseminar la enfermedad entre el ganado, permaneciendo el microorganismo por largos periodos en los ganglios mesentéricos.

B. canis ingresa al hospedero mediante varias vías, pudiendo ser por vía oral, vaginal o conjuntival.

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.

Como se nombra anteriormente, la transmisión horizontal se da principalmente por contacto buco-nasal con materiales de aborto, ya que contienen hasta 10^{10} microorganismos/ml.

Para los cachorros, la leche de la madre infectada significa un medio de transmisión; aunque las crías que nacen y permanecen vivos ya han sido infectados de forma vertical en el útero. (19)

En cambio en los perros, el líquido seminal y la orina son las fuentes de infección, ya que alojan al microorganismo en la próstata y el epidídimo. La bacteria puede ser aislada hasta por seis u ocho semanas post inoculación, a partir del semen. La eliminación intermitente puede darse hasta las 60 semanas. La eliminación urinaria se inicia unas cuantas semanas tras el comienzo de la bacteriemia y continúa como mínimo unos tres meses.

Al principio se pensaba que la orina de los machos no alcanzaba para transmitir la enfermedad, pero estudios revelaron que un macho maduro infectado puede transmitir a uno no infectado por vía buco-nasal después de un largo período de contacto cercano.

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

También puede ocurrir la transmisión mediante vaginoscopía, transfusión sanguínea, inseminación artificial y el uso de jeringas contaminadas. El microorganismo también se encuentra en secreciones salivales, nasales y vaginales no del estro y en la leche de animales infectados no sabiéndose con certeza la importancia de estos líquidos en la transmisión de la enfermedad. (40)

B. canis resiste muy poco tiempo fuera del hospedero, y los desinfectantes comunes la inactivan rápidamente.

4.2.3- Patogenia

La patogenia consta de una fase de:

A) invasión: la cual comprende la penetración en el organismo de la bacteria (siendo posible la infección solo cuando hay un número suficiente de bacterias en contacto con las mucosas: 10^5 por vía conjuntival y 10^6 por vía oral); seguido con la fagocitosis, localizándose a las 24 hs intracelularmente y culmina con una fase de bacteriemia que comienza de 1 - 4 semanas post-infección, durando de 6 a 68 meses pudiendo ser en forma intermitente. La liberación de *B. canis* puede o no estar acompañada de reacción febril. (26, 27)

B) colonización: los sitios privilegiados son los nódulos linfáticos, bazo, hígado, próstata, epidídimo, testículos, útero y placenta. (14, 16)

Es probable que las bacterias sean fagocitadas por macrófagos tisulares y otras células fagocíticas en los sitios mucosos contaminados, y se transporten a tejidos linfáticos y de las vías genitales, donde se multiplican.

Persisten intracelularmente dentro de los fagocitos mononucleares. Dentro de las cuatro semanas post-inoculación se presenta una bacteriemia relacionada con leucocitos y puede durar de 6 a 64 meses.

El mayor número de *B. canis* se encuentra en los ganglios linfáticos, el bazo o tejidos que dependen de los esteroides gonadales.

Aunque la bacteria se limita a los leucocitos mononucleares, en ciertas ocasiones los microorganismos pueden penetrar en otras células como las de la placenta. Una vez colonizado el útero, la bacteria invade el epitelio trofoblástico que envuelve el feto, produciendo una placentitis. Existe replicación a nivel intracelular de las células placentarias, y de allí pasan al epitelio corioalantoideo: tras destruir los trofoblastos, migra a otras células y tejidos vecinos. De hecho, el útero no es un sitio preferido para el crecimiento en las hembras no grávidas o en diestro.

En el macho, la inflamación del epidídimo y los testículos ocasiona un escape de espermatozoides fuera de la barrera hemato-testicular, lo que ocasiona una respuesta inmune para producir un complejo de anticuerpos aglutinantes anti-espermatozoide que no se relacionan con los anticuerpos a *B. canis*. Esta respuesta conlleva a la epididimitis, supresión de la espermatogénesis que conlleva a la infecundidad.

Además de los sitios anteriormente mencionados, donde el microorganismo puede localizarse, también se los puede encontrar en los discos intervertebrales, ojo, riñón y las meninges.

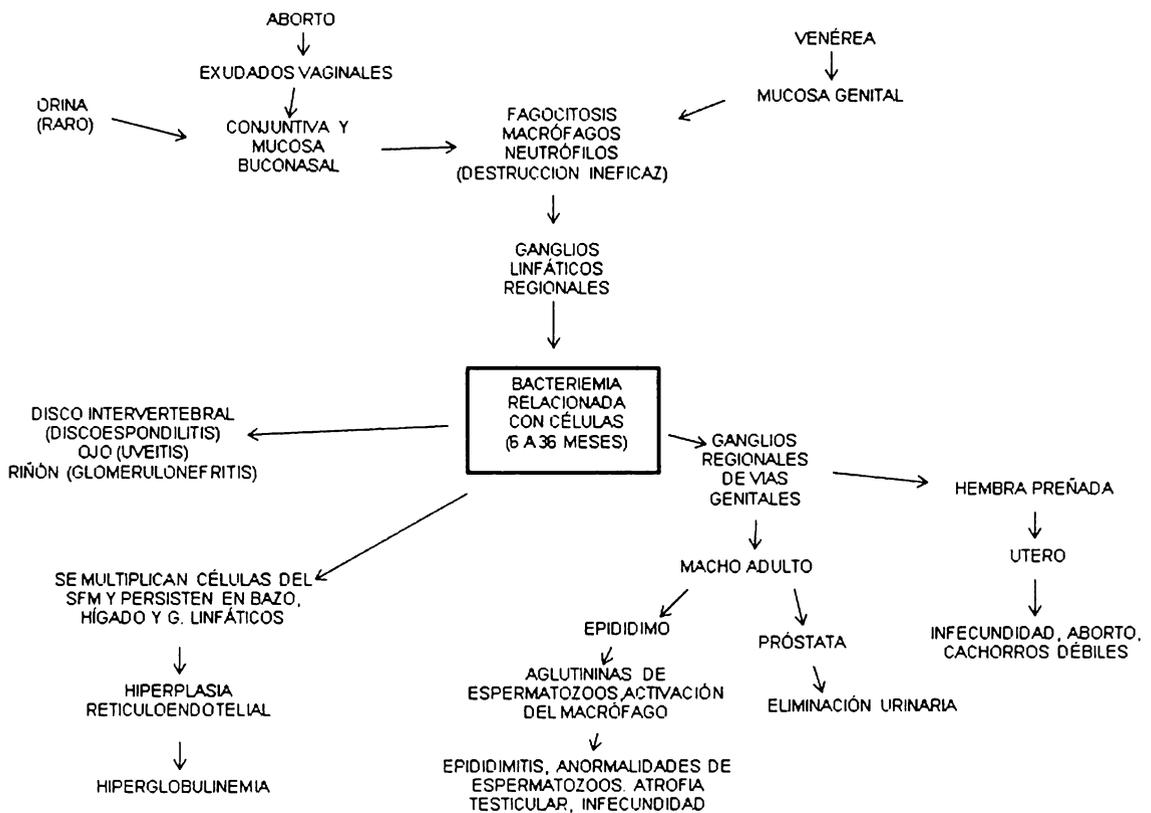


Fig. N°2 Patogenia secuencial de la brucelosis canina. SFM= sistema fagocítico mononuclear

4.2.4- Signos Clínicos

Aún debido a la infección sistémica que causa *B. canis*, rara vez se observan animales adultos muy enfermos. No es común el diagnóstico mediante anamnesis, ya que a excepción del macho que suele tener epididimitis, y rara vez se observa fiebre. Algunos datos que pueden aportar los dueños de los animales, pueden ser pelo sin lustre, seco, falta de vigor y disminución de la tolerancia al ejercicio.

En cambio, en las hembras no gestantes, los signos son nulos, aparte de la linfadenomegalia que ocurre en ambos sexos.

Los signos clínicos suelen incluir alteraciones en la reproducción en animales maduros sexualmente. En el caso de las hembras preñadas, estas abortan cachorros muertos alrededor de los 45 a 60 días de gestación. Los mortinatos suelen estar autolisados con edema subcutáneo y congestión, y hemorragias en la región subcutánea abdominal. También suele encontrarse cantidades moderadas de líquido peritoneal serosanguinolento. La presencia de estos elementos, sugiere la muerte fetal *in útero* un tiempo antes del aborto. El aborto se caracteriza por exudado vaginal de color pardo o gris verdoso durante una a seis semanas. (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 23, 31, 40)

Se puede sospechar de brucelosis canina cuando ocurren fracasos para la concepción en cualquier época posterior al apareamiento. Puede sospecharse muerte en el útero con resorción o aborto fetal e ingestión de fetos si la perra no concibe después de un apareamiento que parece satisfactorio.

La muerte embrionaria puede darse alrededor de los 20 días de fecundación, pero es más frecuente que sucedan abortos no detectados.

Algunas veces las perras suelen parir cachorros muertos y vivos en la misma camada, aunque la mayoría de los últimos mueren en el transcurso de unas cuantas horas o días; pero los que sobreviven o se infectan de recién nacidos suelen tener linfadenomegalia periférica generalizada como signo principal de la enfermedad hasta que llegan a la madurez sexual. Estos cachorros por lo general tienen hiperglobulinemia persistente y algunos presentan fiebre, leucocitosis o convulsiones como manifestaciones sistémicas de la enfermedad. Al igual que en otras brucelosis de los animales domésticos, estas no interfieren con el ciclo estral normal. Las perras que abortan, pueden tener en la camada siguiente perros normales.

Los machos se someten a examen con mayor frecuencia que las hembras a causa de las anomalías testiculares, aunque se observa una permanencia de la actividad reproductiva. Se observa dermatitis escrotal como consecuencia del lamido frecuente e infección secundaria con *Estafilococo* no hemolítico. Una causa importante es el crecimiento de la cola del epidídimo, y rara vez se observan orquitis y crecimiento testicular primario. De hecho los machos con infección crónica suelen presentar atrofia testicular uni o bilateral. Por lo general el volumen del eyaculado está disminuido sin pérdida de la libido. No suelen encontrarse dolor agudo en la palpación escrotal o testicular.

Las anomalías no reproductivas pueden darse a nivel de ganglios y esplenomegalia. Los pacientes con discoespondilitis presentan al inicio dolor raquídeo y después ataxia y paresia si ocurre compresión de la médula espinal. Puede observarse meningoencefalitis después de infecciones experimentales y naturales.

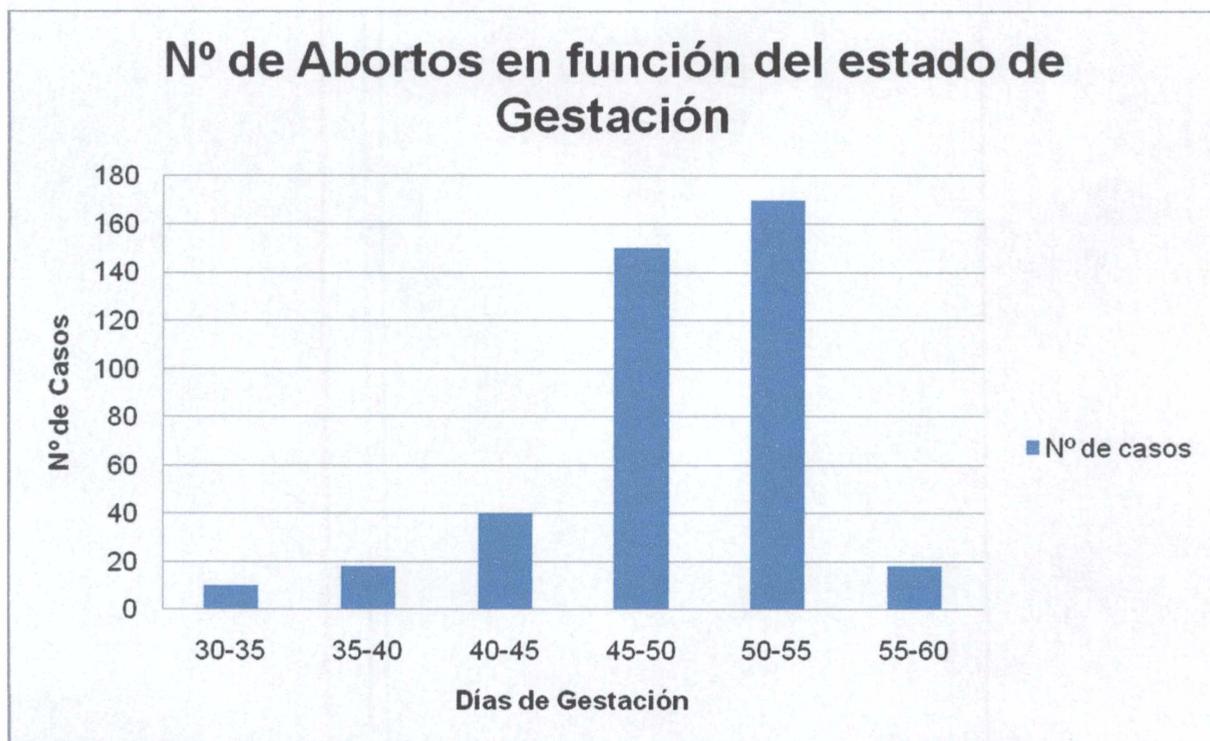


Fig. Nº3: Frecuencia de abortos en función del estado de gestación. Léone A.C. (2000)

Tabla N°2. Accidentes genitales observados luego de la infección por *B. canis*.

	PORCENTAJE
Aborto seguido de un celo normal	10
2 Abortos consecutivos	26
3 Abortos consecutivos	5
Aborto seguido de esterilidad por lo menos en dos ciclos seguidos	10
2 Abortos separados por un celo normal	10
Esterilidad aparente al menos en 2 ciclos consecutivos	23
Esterilidad aparente al menos en 2 ciclos consecutivos seguidos de un aborto	6
2 Abortos seguidos de un celo normal	10

Léone A.C. (2000)

4.2.5- Datos del Laboratorio Clínico

En la brucelosis canina no se alteran los valores hematológicos y bioquímicos o sólo lo hacen de manera inespecífica. El dato más consistente en perros con infección crónica es hiperglobulinemia (β y γ) con hiperalbulinemia concomitante. Las muestras de ganglios linfáticos aumentados de tamaño suelen presentar hiperplasia linfoide con gran número de células plasmáticas. A nivel del LCR, se encuentra neutrófilos y aumento de proteínas con meningoencefalitis, pero no son notables si solo ocurre discoespondilitis. El examen de orina suele dar normal.

4.2.6- Espermiograma

Alrededor de cinco a ocho semanas post inoculación se tornan intensas las anomalías del semen. Incluye espermatozoides inmaduros, acrosomas deformados, piezas medias tumefactas y gotitas protoplasmáticas retenidas. A las 15 semanas se observan colas dobladas, cabezas desprendidas y aglutinación de cabeza con cabeza. Grandes agregados de células inflamatorias, que constituyen neutrófilos rodeando macrófagos que han fagocitado espermatozoides. La aspermia sin células inflamatorias corresponde con la ocurrencia de atrofia testicular bilateral.

4.2.7- Diagnóstico



Para realizar un buen diagnóstico, y poder llegar a la certeza del caso, todos los eslabones deben de unirse.

En el caso de esta enfermedad, la clínica y consecuencias (aborto o epididimitis) pueden guiar hacia una sospecha, pero la certeza la va a dar el laboratorio.

Desde el punto de vista epidemiológico, la enfermedad debe buscarse en aquellos criaderos donde la tasa de aborto supere el 2%, o cuando más del 10% de las hembras servidas no conciben. (41)

En el laboratorio, se tienen varias técnicas para la demostración del agente, tanto directa como indirectamente.

A continuación se describen las mismas, según el material que se posea, se utilizará la correspondiente.

4.2.7.1- Aislamiento Bacteriano

El cultivo y aislamiento de *B. canis* requiere tiempo pero no es difícil porque el microorganismo crece bien bajo condiciones aeróbicas en los medios convencionales que se utilizan para el cultivo de otras *Brucella*. La sangre es el material más práctico para el aislamiento, pero esto no debe utilizarse solamente como diagnóstico, porque es posible que no se observe bacteriemia, aunque suele ser constante, en animales con la infección más crónica. Para la prueba debe utilizarse sangre entera ya que los microorganismos se relacionan con la fracción leucocitaria. La bacteriemia se detecta 2-4 semanas después de la infección buconasal, y si no se trata persiste por mucho tiempo (> 1 a 2 años).

El urocultivo es positivo en algunos caninos, sobretodo en machos cuando el hemocultivo da negativo. Sin embargo a menos que se haga una cistosentesis el aislamiento es muy difícil, debido al gran número de contaminantes que crecen.

El cultivo de semen suele ser satisfactorio durante los primeros tres meses de infección.

B. canis puede aislarse a partir de órganos como ganglios linfáticos, bazo, hígado, médula ósea y órganos masculinos de la reproducción, cuando los perros muertos presentaban hemocultivo positivo. En cambio en las hembras, los tejidos que se

utilizan para el aislamiento son el útero en gestación o en estro, la placenta y los líquidos vaginales y uterinos.

También se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar especies *Brucella* en líquidos y tejidos.

Cultivo y Aislamiento de Laboratorio ppd: Es necesario evitar la contaminación con bacterias de rápido desarrollo en el cultivo de, ya que este género necesita un período más prolongado de incubación que otras bacterias. Antibióticos como bacitracina, polimixina y cicloheximida suelen añadirse a los medios antes del cultivo.

Por lo general las muestras de sangre entera o líquidos se cultivan durante cuatro o cinco días a 37° C en Albimi, soja Trypticase o caldo Tryptose con adición de citrato como anticoagulante. Tras cuatro a siete días de crecimiento, se replica el cultivo en medios sólidos, como agar Tryptose o agar soja Trypticase.

No suele observarse crecimiento antes de las 48 Hs. Las colonias se ven pequeñas y transparentes al principio, pero pueden tornarse mucoides después de varios días de incubación.

Tabla N°3. Confirmación de la infección por *B. canis*.

Material para Cultivo	Tiempo para el cultivo	Resultados Esperados
Exudado posaborto	Cuando se presenta	Positivos
Placenta	Cuando se presenta	Positivos
Material Abortado	Cuando se presenta	Pueden ser Negativos
Semen	3-11 semanas posinfección	Positivos
	12-60 semanas posinfección	Positivos, pero se eliminan poco microorganismos
	>60 semanas posinfección	Negativos
Sangre	5-30 semanas posinfección	100% Positivos
	6-12 meses posinfección	>80% Positivos
	28-48 meses posinfección	50-80% Positivos
	48-58 semanas posinfección	25-50% Positivos
	>58 meses posinfección	< 25% Positivos
Epidídimo	35-60 semanas posinfección	50-100% Positivos
	>100 semanas posinfección	Negativo
Orina	8-30 semanas posinfección	Por lo general positivos; los machos eliminan más m.o.
Próstata	Hasta 64 semanas posinfección	Por lo general positivos
G.L., Bazo y Médula	Cuando el animal es bacterémico	Por lo general positivos
Ósea	Cuando el animal no es bacterémico	Positivos o Negativos
Ojo	Cuando hay uveítis	Por lo general positivos
Disco Intervertebral	Cuando hay discoespondilitis	Positivos o Negativos

Léone A.C. (2000)

4.2.7.2- Pruebas Serológicas

Las técnicas serológicas de diagnóstico son las más usadas para detectar brucelosis canina, aunque ello implica un gran error en la interpretación de los resultados, ya que los Ags. Lipopolisacáridos (LPS) de varias especies bacterianas pueden reaccionar en forma cruzada con los Ags de *B. canis*. La reacción cruzada que se produce tiende a ocasionar falsos positivos más que falsos negativos. Otra causa de errores en la interpretación, la suele dar la presencia de sangre hemolisada en la muestra, ya que esto también determina la obtención de falsos positivos.

Los resultados por lo general son negativos en las primeras tres o cuatro semanas post-infección, a pesar de la presencia de bacteriemia alrededor de dos semanas PI.

Por dicha razón los animales sospechosos negativo deberían ser testeado a los 30 días siguientes. Títulos bajos o intermedios pueden significar enfermedad previa o infección muy reciente y es necesario repetir la prueba o intentar aislar el m.o. realizando cultivo a partir de la sangre.

En las perras se observa una recrudescencia de la bacteriemia y un incremento de los títulos de Ac durante el proestro, el estro, la gestación o abortos.

La antibioticoterapia puede suprimir la bacteriemia y la respuesta serológica relacionada. No debe administrarse antibióticos en tanto las pruebas diagnósticas no se terminen. Los fármacos de las tetraciclinas causan abacteriemia y una disminución correspondiente del título de Ac que puede presentar en rebrote tras suspender el tratamiento porque estos medicamentos no son bactericidas.

Un título de aglutinación alto aislando *B. canis*, suele indicar infección activa, pero debe apoyarse mediante pruebas adicionales. Los perros que son asintomáticos pero que tienen resultados positivos en los procedimientos de aglutinación nunca deben de considerarse infectados en tanto los resultados de hemocultivo o la prueba de IDGA de AgCP más específica no confirmen los hallazgos positivos. Con excepción del método de IDGA-AgCP, todas las pruebas miden Acs a Ags de LPS y pueden dar resultados inespecíficos.

Prueba de aglutinación rápida en portaobjetos (PARP). Se prefiere esta técnica con 2-ME como procedimiento de selección en consultorio porque es rápida y sensible, y detecta Acs temprano. Hay una correlación del 99% entre una prueba negativa y la ausencia de infección. Una modificación de la PARP, en la que se utiliza una variante menos mucoide (M-) de *B. canis*, reduce en forma adicional el índice de resultados positivos falsos. Por lo tanto la PARP-ME con el antígeno M- de *B. canis* puede utilizarse para confirmar los resultados positivos de las pruebas de selección.

Prueba de aglutinación en tubo (PAT). Lo mismo que la PARP, la PAT también se altera por reacciones heteroespecíficas con otros agentes infecciosos y por títulos equívocos en animales con infección crónica; por ello se utiliza la modificación ME. Los resultados de la PARP-ME correlacionan bien con los de la PAT-ME y ambas deben considerarse como pruebas de selección.

Prueba de IDGA. Revelan Acs en los sueros de perros infectados 5-10 semanas PI, y persisten varias semanas o meses después que la bacteriemia cesa. La prueba de IDGA que utiliza Ags de LPS (somáticos) tienen el mismo problema que las técnicas de aglutinación con respecto a la reacción cruzada con otras bacterias Gram negativa, pero es posible diferenciar los sueros positivos verdaderos de los falsos por una banda de precipitación precisa para *B. canis*. Igualmente rara vez se utiliza este Ag para el diagnóstico por falta de estandarización y la dificultad para interpretar los resultados.

Mientras tanto, la prueba IDGA-AgCP que utiliza antígenos internos (proteínas citoplasmáticas) es muy específica, pudiendo detectar Acs en sueros de caninos cuando en otras pruebas son equívocas e incluso negativas. Por ende esta técnica debería de utilizarse como prueba de confirmación después de otros métodos serológicos. Una de las desventajas de esta técnica es el período más prolongado entre la infección y la presencia de Acs detectables. En el caso de ser positiva, debe de tenerse en cuenta que tanto las *Brucella* lisas como rugosas comparten los Ags proteínicos internos, y por consiguiente se tendría que sospechar en la infección con otras *Brucella* (*B. suis* o *B. abortus*) cuando se utiliza AgCP. Mientras que no se observan falsos positivos con bacterias de otro género. Es posible que algunos perros presenten resultados falsos negativos, tal vez por infecciones tempranas, cuyos sueros son positivos a PARP y negativos a IDGA. El único medio definitivo para resolver esta diferencia sería el hemocultivo.

ELISA. La especificidad de la técnica depende del Ag a utilizar. Hay una ELISA que utiliza un Ag de pared celular altamente purificado, lo que lleva a ser una técnica altamente específica, pero menos sensible que la PAT en la selección de perros infectados. Un extracto salino caliente de la cepa variante menos mucoide (M-) de *B. canis* mejora la sensibilidad de ELISA. Se ha utilizado una proteína recombinante de *B. abortus* (BP26) como Ag en un ELISA indirecto para el diagnóstico de *B. canis* dando una sensibilidad y especificidad del 96%, siendo conservada para el género *Brucella*. (4)

Tabla N°4. Comparación de procedimientos serológicos para brucelosis canina

Prueba Serológica	Antígeno utilizado	Título más temprano(a) (Semanas PI)	Ventajas	Desventajas
PARP-ME	Pared celular	3-4	Rápida, sensibilidad alta, pocos resultados negativos falsos (1%)	Resultados positivos falsos comunes; debe confirmarse con otras pruebas
PAT	Pared celular	3-6	Determinación semicuantitativa	Resultados positivos falsos similares a PARP
PAT-ME	Pared celular	5-8	Igual que PAT, especificidad un poco mayor	Más tiempo para obtener un título positivo comparada con PAT
IDGA con Ag de pared celular (somático)	Pared celular (LPS)	5-10	Muy sensible, positiva antes que con AgCP	Procedimiento e interpretación complejos, reacciones inespecíficas
IDGA-AgCP	AgCP	8-12	La prueba más específica (confirmadora), detecta casos crónicos cuando otras pruebas son negativas; detecta infecciones por otras especies de <i>Brucella</i>	Procedimiento complejo, menos sensible para la selección inicial, duración de tiempo variable con la positiva; puede permanecer positiva hasta un año después de recuperarse de la infección
IF indirecto	Pared celular (LPS)	Desconocido	Disponible y conveniente para laboratorios de diagnóstico	Puede ser menos sensible que PAT-ME como prueba de selección No se ha valorado extensamente
ELISA	Pared celular (LPS) o AgCP	Desconocido	Buenos resultados con <i>B. canis</i> mutante (M-) para extractos de pared celular o <i>B. abortus</i> para AgCP	La pureza y la preparación del antígeno son fundamentales

(a) El primer título significativo que aparece. Datos basados en un perro adulto.

ME= mercaptoetanol; PARP= prueba de aglutinación rápida en portaobjetos;

PAT= prueba de aglutinación en tubo; IDGA= inmunodifusión en gel de agar;

AgCP= antígeno de proteína citoplasmática interna; LPS= lipopolisacárido; IF= inmuno fluorescencia

Carmichael L. E.

4.2.8- Diagnóstico Diferencial



Aunque la enfermedad puede darse en animales pre-púberes o hembras maduras no gestadas y pasar como una infección desapercibida, o confundida como cualquier afección pasajera, sin pasar a mayores.

La diferencia en si toma importancia cuando el signo principal es el aborto de la hembra o la epididimitis en el macho.

Las bacterias responsables de aborto son a menudo no específicas, algunas existen en estado saprófito en la vía genital femenina (*E. coli*, *Streptococcus* spp) causando infección genital en momentos que bajan las defensas de la hembra o por contaminación uterina.

En el caso del macho, la orquiepididimitis puede ser causada también por *B. abortus* o por multiplicación excesiva de bacterias saprófitas de la piel debido al lamido excesivo.

Para la discoespondilitis, el agente más común encontrado es el *Staphylococcus aureus*.

4.2.9- Lesiones Histológicas

Las alteraciones macroscópicas en adultos o cachorros que sobreviven suele limitarse a linfadenomegalia y esplenomegalia. El crecimiento de los ganglios se debe a hiperplasia linforreticular difusa. En perros con bacteriemia crónica los sinusoides de estas estructuras y del bazo están llenos de células plasmáticas y macrófagos que contienen bacterias fagocitadas.

En todos los órganos genitourinarios se observa infiltración linfocítica submucosa difusa. Ocurre vasculitis necrosante en los tejidos blanco de esteroides gonadales, incluso en próstata, escroto, o vulva. La necrosis extensa del parénquima prostático y de los túbulos seminíferos se debe a infiltración de células inflamatorias, que por ultimo causan atrofia o fibrosis.

Ocurre endometritis subaguda a crónica en el útero, con hiperplasia glandular y nódulos de células reticulares.

También se describe necrosis hepática focal, miocarditis y meningoencefalitis. Se observa glomerulonefritis intersticial leve. La afección ocular consiste en iridociclitis

granulomatosa y retinitis exudativa, que consiste en infiltración difusa de linfocitos, plasmocitos y neutrófilos.

4.2.10- Inmunidad Vacunal

No se han preparado vacunas apropiadas contra *B. canis*, sin embargo George intentó producir inmunidad con una mutante viva dependiente de estreptomicina, sabiendo de la importancia de la estimulación celular en su inmunidad (31). El mismo señaló que luego de la infección por *B. canis* se observaba niveles elevados de resistencia.

4.2.11- Control y Prevención

Al no existir vacuna y la imposibilidad de un tratamiento médico eficaz, la prevención de la infección es el método más eficaz para evitar la enfermedad. (20)

La prevención requiere de pruebas anuales de todos los perros reproductores y el análisis de todos a ser introducidos en un kennel. Solo los perros probados no infectados deben ser utilizados. (20)

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

En el caso que se quiera ingresar un nuevo reproductor, este debe ser testeado dos veces, con un intervalo de 4-6 semanas previos al ingreso, teniendo que dar negativos en ambos. En el caso que la hembra aborte, se debe asumir la enfermedad hasta que no se compruebe lo contrario. Si un macho pierde la libido, o desarrolla anomalías testiculares debería ser examinado por brucelosis. (20)

El análisis y eliminación de los perros infectados es el único método probado de erradicación de *B. canis* de un kennel infectado. (20)

En el caso de que el animal infectado sea mascota de alguna familia, lo más apropiado sería el castrado inmediato luego del diagnóstico y el comienzo de la terapia antimicrobiana correcta.

4.2.12- Terapéutica

La localización intracelular de la bacteria determina la eficacia del tratamiento antimicrobiano. La *B. canis* es susceptible a varios antibióticos, pero la ineficiencia del tratamiento in vivo suele originar fracasos o recaídas.

Como medida mínima, las mascotas infectadas deben de ser castradas y recibir un régimen de antibioticoterapia para reducir la posibilidad de infectar a miembros de la familia a través de secreciones genitales. El m.o. puede permanecer en los tejidos de los animales castrados, pero se piensa que es menos probable que se eliminen. Se recomiendan cursos repetidos de terapia antimicrobiana con base en pruebas serológicas y hemocultivo de seguimiento.

La curación de la brucelosis no debe suponerse porque es posible que la bacteriemia recurra semanas o meses después de suspender los antibióticos.

Antibioticoterapia. Se utilizan varios quimioterápicos para el tratamiento de esta enfermedad, pero rara vez el m.o. se elimina si no se emplea la combinación y régimen correctos.

In vitro se observó que es sensible a tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos, espectinomicina, rifampicina, ampicilina y fluoroquinolonas. Además se observó sinergia entre las tetraciclinas y fluoroquinolonas, y aminoglucósidos y sulfonamidas. La monoterapia con fluoroquinolonas se acompaña de fracasos terapéuticos y recaídas, sobre todo en casos de uveítis o discoespondilitis.

La terapéutica oral con dosis altas de minociclina (10 mg/Kg cada 12 hs) o doxiciclina combinada con estreptomina IM (4,5 mg/Kg cada 24 hs), durante 7 días proporcionó el índice más alto de éxitos en perros con infección experimental.

4.2.13- Salud Pública

Al igual que otras especies de *Brucella*, *B. canis* infecta accidentalmente al hombre, siendo una zoonosis de baja intensidad.

Los síntomas de la infección en el humano suelen ser: fiebre, cefaleas, escalofríos, pérdida de peso, linfadenopatía, faringitis y malestar general, lo que muchas veces suele pasar como un caso de Influenza.

Algunas complicaciones que pueden darse son: endocarditis, meningitis, artritis, hepatitis y abscesos viscerales.

5- OBJETIVOS

General: Diagnosticar serológicamente la presencia de *B. canis* mediante la técnica RSAT-2ME en sueros de perros del Bº Horacio Quiroga de Salto.

Específico:

- Censar la población canina del barrio.
- Preparar Ag a partir de una variante M- de *B. canis* para utilizar en la técnica.
- Crear un banco de sueros para posteriores estudios.

6- HIPÓTESIS

“En el Barrio Horacio Quiroga hay presencia de perros con serología positiva a *Brucella canis*”.

7- MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realiza en el barrio Horacio Quiroga de la ciudad de Salto. El mismo se encuentra ubicado en el sur de la ciudad, situado a 1,5 Kms. hacia el Este del río Uruguay. Se encuentra delimitado hacia el norte por la Avenida Manuel Patulé, al sur por la Av. Pascual Harriague, hacia el oeste por calle Industria y al este por calle 7. (Fig. N°4)

Desde el punto de vista estructural, el barrio está dividido en 21 manzanas, lo cual facilita el estudio epidemiológico. (Fig. N°5)

En el mismo conviven aproximadamente 1000 familias, con un nivel socio económico medio-bajo. El trabajo abarca los meses de marzo a julio de 2011.



Fig. N° 4. Imagen satelital de la ciudad de Salto. Google Earth

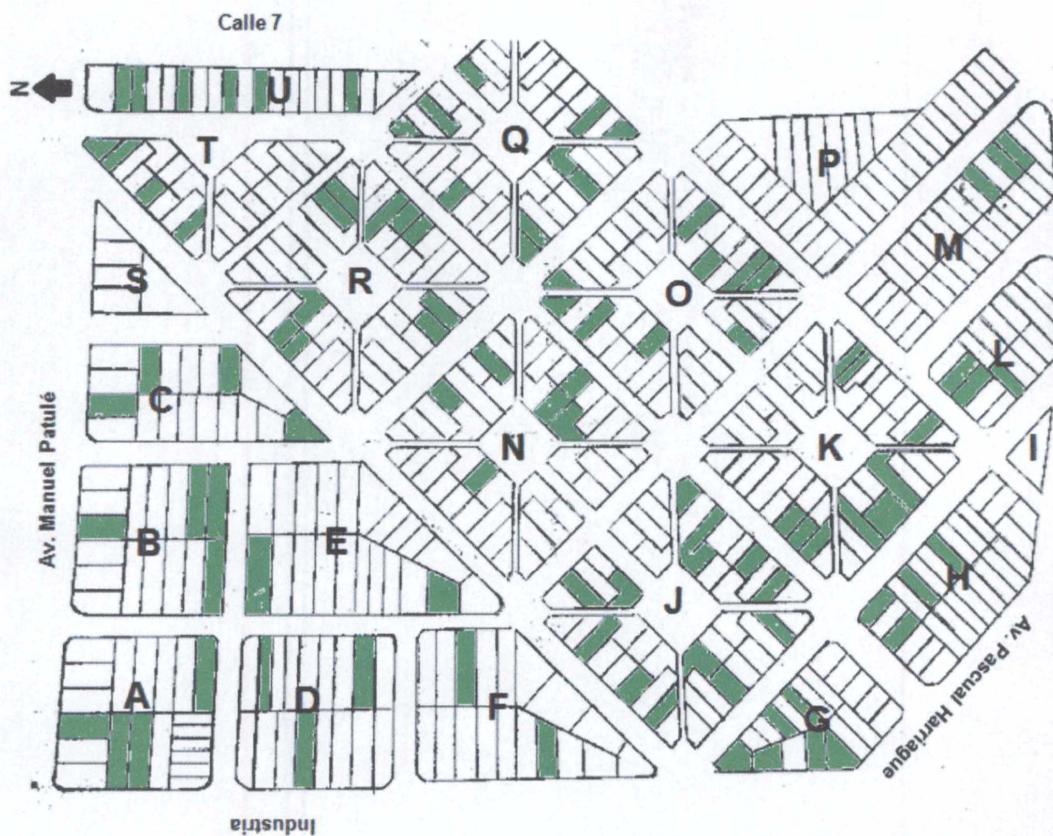


Fig. N° 5. Plano del B° Horacio Quiroga, con hogares muestreados (verde).

7.1- Censo y Muestra Sanguínea

En una primera instancia se realiza un censo canino del barrio que consiste en la recolección de los siguientes datos: nombre y apellido del encargado de los animales, el número de caninos que hay en la casa, el sexo de los animales, si son castrados o no y la edad de los mismos (formando grupos: menores a 1 año, entre 1-5, entre 5-10 y mayores de 10 años), también se le pregunta a la persona si los caninos poseen atención veterinaria, y si permitirían extraerles sangre.

Luego de finalizado el censo, se pasa a organizar la información recopilada y se sortean los hogares que van a participar dentro del muestreo.

Para esto, se tiene en cuenta:

- ✓ el número de hogares censados por manzana (ya que no todas poseen la misma cantidad)
- ✓ la cantidad de los mismos que permiten extraer muestra a sus mascotas
- ✓ la cantidad de muestra mínima a extraer ($n \geq P.Q (z/e)^2 = 73$ muestras).

De todos estos valores se extrae el número de muestras que se deben sacar por manzana, y después de saber la cantidad, se eligen al azar mediante bolillero los hogares a testear.

En el momento de extraer la muestra de sangre, en hogares que tienen más de un perro, se elige al azar un solo animal por hogar. Además se completa una nueva planilla con datos del propietario, el sexo del animal y si es entero o castrado, la edad, y si ha tenido signos de la enfermedad (se averigua si abortó la perra, parió cachorros muertos, o si mueren enseguida de nacer; en el caso de los machos el dato clínico observado y preguntado es la inflamación testicular).

La sangre se extrae por venopunción de la vena cefálica (3-5 ml), con jeringa y aguja hipodérmica 21G, en forma aséptica e individual, sin anticoagulante. Luego se procesa en el laboratorio de Patología Veterinaria de Regional-Norte Salto.

En el mismo se extrae el suero por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, y se guardan en ependorff identificados muestras por duplicado a -80° C hasta el momento de realizar la prueba.

Para realizar la técnica y controlarla, se poseen sueros caninos, uno positivo y uno negativo a *B. canis*, cedido por el Área de Enfermedades Infecciosas de Facultad de Veterinaria de la UdelaR. (5)

7.2- Elaboración del Antígeno

El Antígeno a utilizar se elabora siguiendo el criterio establecido por L. E. Carmichael (17), a partir de una cepa Suave Mucoide (M-) de *Brucella canis*, perteneciente al cepario del Departamento de Ciencias Microbiológicas de Facultad de Veterinaria de la UdelaR.

Medio de cultivo

Prepara 1 Litro de Brucella agar o Trypticase soya agar (2-2.5%) y autoclavar. Calentar a baño maría a 56°C por 1 hora. Usando una técnica estéril, colocar 100 ml de agar en 8-10 botellas estériles de Roux con tapón de algodón. Mantener el agar a temperatura ambiente. Luego invertir las botellas e incubar a 37°C. Dejar secar por 1 día y examinar la esterilidad.

Siembra

Transferir la cepa M- de *Brucella canis* al agar inclinado.

Verificar la pureza en una placa de agar, incubar de 1-3 días.

Sembrar inclinado usando 5 ml de caldo *Brucella*.

Inoculación y cultivo de células:

- ✓ Inocular cada botella de Roux (después de agregarle perlas de vidrio estériles) con 5 ml de suspensión de *B. canis*.
- ✓ Esparcir la inoculación sobre el agar con las perlas de vidrio estériles con una rotación adecuada. (no rápidamente)
- ✓ Invertir las botellas e incubar por 36-40 horas a 37°C (cosechar cuando la confluencia crezca, la cepa de *B. canis* se convertirá en una sustancia viscosa después de días de crecimiento)
- ✓ Cosechar agregando 10-15 ml de PBS estéril (pH 7,4) a cada botella de Roux.

- ✓ Remover las células con una rotación adecuada con las perlas de vidrio, teniendo cuidado de no romper o quebrar el agar.
- ✓ Lavar el agar una vez con 5 ml de PBS
- ✓ Recoger en frascos de centrifugas estériles (500 ml), pasarlo a través de un embudo con gasa (de 4-6 capas). Revisar la viscosidad, no debería estar viscoso ni agrupado a un pH 7.4 (PBS). Verificar su pureza.
- ✓ Lavar 3 veces con PBS en una centrifuga refrigerada a 5000 rpm por 15 a 20 minutos.
- ✓ Inactivar la Brucella a 80°C por 1 hora (se puede agregar mertiolate en una dilución final de 1: 10.000 – 1% stock 1:100)
- ✓ Resuspender el lavado de las células en 7% de PVC o en 80-100ml de PBS.

Teñido del antígeno

- ✓ Agregar 5 ml al 1% de Rosa Bengala (Fisher or Sigma, 90% teñir) filtrar en papel Whatman por cada 100 ml de suspensión bacteriana en PBS.
- ✓ Agitar sobre agitador magnético a velocidad moderada toda la noche a 4°C. Evitar que se forme espuma
- ✓ Centrifugar 6000 rpm 20 minutos, quedando como sedimento las bacterias.
- ✓ Resuspender en forma vigorosa en buffer tris-maleato, 0,4 molar, pH 8,5-8,6, usando agitador magnético (a un pH más bajo, 7,5 tienden a aglutinarse las bacterias).
- ✓ Filtrar a través de un embudo con gasa de 4-6 capas removiendo las bacterias aglutinadas que se pueden formar especialmente si los organismos quedan viscosos.

7.3- Ejecución de la técnica RSAT-2ME

La técnica de RSAT-2ME consiste en los siguientes pasos:

- ✓ En un portaobjeto, se colocan 25µl de suero positivo a la izquierda, al medio 25µl de suero problema y a la derecha 25µl de suero negativo, y luego se mezclan con 25 µl de 2-Mercaptoetanol 0,2 M.
- ✓ Esperar 1 minuto
- ✓ Agregar 50 µl del antígeno agitando suavemente el portaobjetos durante 2 minutos
- ✓ Lee en microscopio óptico (10x)

Los sueros que resulten positivos se les realiza la prueba de micro aglutinación a título final consistente en:

- ✓ Realizar la prueba de micro aglutinación
- ✓ Si el resultado es positivo, efectuar diluciones crecientes del suero problema en solución salina fisiológica normal, comenzando con la dilución 1:2
- ✓ En un portaobjeto, mezclar 10 µl de cada dilución del suero con 10 µl de antígeno (previamente homogeneizado a temperatura ambiente)
- ✓ Rotar suavemente el portaobjeto con la mezcla, durante 2-3 minutos
- ✓ Leer al microscopio (10x)
- ✓ El resultado de la prueba es la última dilución del suero que presente aglutinación.

8- RESULTADOS

8.1- Censo y muestra sanguínea

Se censó el 90 % de los hogares del Barrio Horacio Quiroga lo que corresponde a 364 hogares. Se registraron 673 perros, dando una relación animal-hogar de 1,8. Se extrajo sangre a 108 animales (Fig. N°5), estas se remitieron al laboratorio para su procesamiento.

Solamente el 18 % de los hogares tenían afiliados a sus mascotas en Clínicas Veterinarias.

En las tablas N° 5, 6, 7 y 8 se detallan los datos recabados en el censo.

Tabla N°5. Datos del Censo

Manzana	N° Perros	Sexo				Edad				Atención Veterinaria		Encuestados	Terrenos Visitados
		Hembra Enteras	Hembra Castrada	Macho Enteros	Macho Castrado	<1	1-5	5-10	>10	Si	No		
A	40	7	7	17	-	6	17	6	4	5	7	12	19
B	12	4	2	4	-	-	6	2	1	1	5	7	9
C	26	5	3	11	-	4	10	4	2	2	8	12	16
D	21	8	1	10	2	5	12	3	1	4	9	13	13
E	19	3	5	8	-	3	6	6	1	2	4	7	10
F	14	3	2	6	-	2	4	2	-	-	5	5	9
G	20	4	1	11	-	2	5	2	2	2	4	8	13
H	9	4	2	3	-	1	6	1	-	1	5	13	14
J	78	21	15	30	6	13	34	18	2	8	23	33	40
K	44	7	9	14	6	9	17	7	3	6	11	17	24
L	20	3	6	10	-	-	6	11	2	3	4	7	8
M	18	3	4	9	1	4	6	6	1	2	6	8	9
N	54	13	9	20	-	7	21	9	4	8	14	22	28
O	76	24	8	33	2	32	22	13	1	7	17	23	29
P	54	10	13	20	4	13	20	11	5	4	18	23	26
Q	58	19	6	23	-	10	26	3	3	2	25	27	35
R	61	20	7	30	-	23	25	9	-	9	17	30	33
S	5	-	1	4	-	1	1	3	-	-	2	2	3
T	17	2	1	13	-	3	8	3	1	2	6	10	12
U	27	8	2	17	-	7	13	6	1	-	12	14	14
20	673	168	104	293	21	145	265	125	34	68	202	293	364

ENCUESTADOS: son aquellos hogares donde se encuesta a personas (N° Perros + Atención Veterinaria).

TERRENOS VISITADOS: son aquellos hogares donde se han visto animales (Encuestados + No Encuestados Con Perros). Los No Encuestados, no se sabe At. Vet., sexo, ni edad de los animales.

Tabla N°6. Discriminación entre entero y castrado por sexo.

Sexo		%
Hembra	Entera	29
	Castrada	18
Macho	Entero	50
	Castrado	3

Tabla N°7. Discriminación por edad

Edad	%
<1 año	26
Entre 1-5 años	46
Entre 5-10 años	22
>10 años	6

Tabla N°8. Datos de animales sangrados

	SEXO				EDAD				DATOS		
	HEMBRA		MACHO		<1	1-5	5-10	>10	Aborto	Nacen	Orquitis
	E	C	E	C						Mueren luego	
	36	16	49	7	17	56	26	9	-	16	2
% del Total	21	15	17	33	12	21	21	26			

E: entero/a. **C:** castrado/a. **% del Total:** representa el porcentaje de animales muestreado del total de la categoría.

8.2- Antígeno

El antígeno elaborado y utilizado se estandarizó a una concentración del 7 % de volumen celular y a un pH final de entre 8,5 y 8,6. El antígeno se enfrentó a sueros positivos y negativos a *Brucella canis* pertenecientes al Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria.

8.3- Estudio de los sueros problemas por la Técnica RSAT-2ME

Todos los sueros estudiados fueron negativos en la prueba de RSAT-2ME. En la tabla N° 9 se detallan los resultados.

Tabla N° 9. Resultados de la técnica RSAT-2ME

N° Suero	Resultado	N° Suero	Resultado	N° Suero	Resultado	N° Suero	Resultado
A 3	-	J 7	-	N 33	-	R 12	-
A 11	-	J 14	-	N 34	-	R 19	-
A 19	-	J 17	-	O 8	-	R 20	-
A 20	-	J 23	-	O 9	-	R 24	-
B 4	-	J 25	-	O 12	-	R 25	-
B 10	-	J 28	-	O 13	-	R 26	-
B 11	-	J 30	-	O 24	-	R 36	-
B 12	-	J 36	-	O 28	-	R 37	-
C 2	-	J 40	-	O 29	-	T 2	-
C 5	-	J 44	-	O 32	-	T 5	-
C 9	-	K 2	-	O 37	-	T 8	-
C 11	-	K 3	-	P 8	-	T 9	-
D 3	-	K 4	-	P 9	-	U 3	-
D 9	-	K 24	-	P 10	-	U 9	-
D 15	-	K 25	-	P 16	-	U 11	-
E 1	-	K 31	-	P 19	-	U 14	-
E 13	-	K 39	-	P 32	-	U 17	-
F 4	-	K 40	-	P 35	-	U 18	-
F 13	-	K 41	-	Q 5	-		
G 2	-	K 25(bis)	-	Q 13	-		
G 4	-	L 3	-	Q 15	-		
G 5	-	L 4	-	Q 19	-		
G 8	-	L 16	-	Q 29	-		
G 10	-	M 14	-	Q 31	-		
H 4	-	M 16	-	Q 38	-		
H 6	-	M 17	-	Q 39	-		
H 8	-	N 11	-	Q 43	-		
H 11	-	N 16	-	Q 44	-		
J 2	-	N 19	-	R 5	-		
J 4	-	N 28	-	R 6	-		

9- DISCUSIÓN

Este es el primer censo de caninos efectuado en un barrio y en la ciudad de Salto. Los datos obtenidos indican una relación de machos y hembras aproximadamente del 50% de cada sexo. Epidemiológicamente esto favorecería la propagación de esta enfermedad (y de otras reproductivas) entre los animales, ya que el 79% (50% machos; 29% hembras) de los animales no está castrado y el 68% de estos se encuentran en un rango de edad entre 1 y 10 años, o sea, en edad reproductiva.

En la información recabada sobre signos de la enfermedad se destaca la presencia de cachorros nacidos muertos. Este signo también puede ser producido por otras enfermedades reproductivas de origen viral, bacteriano y parasitario.

Un dato interesante encontrado en la encuesta es la no dosificación por parte del propietario contra parásitos internos y externos.

Este es el primer trabajo, en este tema, realizado sobre la totalidad de la población canina de un barrio en el Uruguay. Se llevaron a cabo otros estudios pero la población canina evaluada fueron perros callejeros, consultas atendidas en el Hospital de Facultad Veterinaria y perros de establecimientos lecheros (5, 22, 45).

La elaboración del antígeno a partir de la variante M(-) de *Br. canis* descrita por Joubert y Carmichael (17) es sencilla y rápida de realizar por laboratorios de microbiología básica.

La RSAT es una técnica fácil y rápida para la búsqueda de anticuerpos en sueros sanguíneos, presentando como dificultad la lectura de la reacción, ya que debe de realizarse mediante microscopio óptico.

Igualmente, el diagnóstico serológico de esta enfermedad puede realizarse mediante varias técnicas como se nombra al principio del trabajo. En este caso, se realizó la RSAT-2ME a todas las muestras de sueros obtenidas, ya que la adición de 2-ME aumenta la sensibilidad de la misma, al inhibir la acción de las IgM, disminuyendo la probabilidad de falsos positivos.

La técnica tiene una sensibilidad del 99%, lo que nos hace entender que los sueros testeados no presentan anticuerpos contra *Brucella canis*.

Como discusión global del trabajo, en el barrio no se encontraron animales con serología positiva a *Brucella canis*. Esto no es traspolable al resto de la ciudad de Salto ya que para esto se necesita un estudio de mayor alcance.

Se debería profundizar en este estudio con la búsqueda del microorganismo por medio del aislamiento del agente a partir de material con problemas reproductivos. Los datos epidemiológicos observados y recabados (animales con ingreso y salida del barrio sin encontrar barreras físicas, andar sueltos todo o la mayor parte del día, contacto estrecho entre los mismos y no castrados) hacen de este lugar un hábitat propicio para la presencia y propagación de esta enfermedad y de otras.

10- CONCLUSIÓN

Este trabajo concluye que en el Barrio Horacio Quiroga de la ciudad de Salto no hay presencia de animales sero-positivos a *Brucella canis*, mediante la técnica RSAT-2ME.

11- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Acha P.N. (1989). *Zoonoses et maladies transmissibles communes a l homme et aux animaux* 2a. ed. Paris, O.I.E. p. 705
- 2- Adesiyun A.A. (1986). *Prevalence of Brucella abortus and Brucella canis antibodies in dogs in Nigeria*. J. Small Anim. Pract., 27: 31-37.
- 3- Agalar C. (1999). *Ciprofloxacin and rifampicin versus doxycycline and rifampicin in the treatment of brucellosis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 18 (8) : 535-538.
- 4- Arese A. (1997). *Uso de un test de ELISA indirecto para el diagnóstico de brucelosis canina utilizando una proteína recombinante como Antígeno*. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinaria Conbravet. Gramado. Brasil. p. 156.
- 5- Bacigalupo N., Goldberg V., Tambasco P. (2006). *Brucella canis: Diagnóstico serológico*. Tesis de Pré-grado. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Uruguay. p. 39.
- 6- Baldi P.C. (1994). *Brucella abortus cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis*. Vet. Mic., 41 (1-2): 127-134.
- 7- Baldi P.C. (1997). *Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of Brucella spp*. Vet. Mic., 51: 273-281.
- 8- Berthelot. (1993). *Brucelloses canines*. Point Vet., 25 (152): 125-129.
- 9- Boeri E. (2001). *Un caso de brucelosis canina*. In Vet., 3 (1-2): 183-185.

- 10- Bricker B. (2002). *PCR as a diagnostic tool for brucellosis*. Vet. Micro. 90: 435- 446.
- 11- Briseño González, H.; Páramo Ramírez, R. M.; Flores Castro, R.; Suárez Güemes, F. (2004). *Reproductive problems in male dogs infected with Brucella canis*. México City: Veterinaria-México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: 35 (2): 121-128.
- 12- Brown J., Blue J., Wooley R., Dreesen D., Carmichael L. (1976). *A Serologic Survey of a Population of Georgia Dogs for Brucella canis and an Evaluation of the Slide Agglutination Test*. JAVMA, 169: 1214-1216.
- 13- Carmichael L.E. (1966). *Abortion in 200 Beagles*. JAVMA., 149 (8): 1126.
- 14- Carmichael L.E. et. al. (1968). *Characteristics of a newly-recognized species of Brucella responsible for infectious canine abortions*. Cornell Vet., 349: 579-592.
- 15- Carmichael L. E., Kenney R. (1968). *Canine Abortion Caused by Brucella canis*. JAVMA, 152 (6): 605-616.
- 16- Carmichael L.E. (1970). *Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response*. JAVMA, 156 (12): 1726-1734.
- 17- Carmichael L., Joubert J.C. (1987). *A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of Brucella canis infection that employs a variant (M -) organism antigen*. Cornell Vet., 77: 3-12
- 18- Carmichael L.E. (1981). *Brucellosis causada por Brucella canis*. Ciencia Vet. 3: 178-197.
- 19- Carmichael L.E. (1988). *Transmission of Brucella canis by contact exposure*. Cornell Vet., 78 : 63-73.

- 20- Carmichael L.E. (1990). *Brucelosis canina causada por B. canis : enfermedad clínica ; problemas en inmunodiagnóstico*. Rev. Med. Vet. (Bs As) ; 80: 102-106.
- 21- Carvalho M., Molnár E., Morais V., Silva J. (1997). *Brucelose canina em Belém; Avaliação sorológica*. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinaria Conbravet. Gramado. Brasil. p. 308.
- 22- Chans N., Gil A., Suanes A., Nuñez A., Piaggio J. (2007). *Brucelosis Canina en los perros de los establecimientos lecheros del Uruguay*. Vª Jornadas Técnicas Facultad Veterinaria. Montevideo. Uruguay. p. 41.
- 23- Cicutta M. E. (1990). *Primer aislamiento de Brucella canis en la ciudad de corrientes, Argentina*. Vet. Arg. 7 (67): 463-465.
- 24- Ciftci, E.; Ince, E.; Dogru, Ü. (2003). *Pyrexia of unknown origin in children: a review of 102 patients from Turkey*. Ann. Trop. Paed. 23 (4): 259-263.
- 25- Davis B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H. (1984). *Tratado de Microbiología: con inclusion de genetica molecular*. 3a ed. Barcelona: Salvat. p. 1097.
- 26- Diaz R. (1968). *Antigenic relationship of the Gram negative organism causing canine abortion to smooth and rouge Brucellae*. Jo. Bacter. 95 (2): 618-624.
- 27- Egwu I. N. (1979). *Cytological changes related to Brucella canis variants uptake in vitro*. ME. Microbiol. Immunol, 167: 107-115.
- 28- Flores-Castro R. (1976). *A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in México*. Cornell Vet., 66: 347-352.
- 29- George L., Carmichael L. E. (1974). *A Plate Agglutination Test for the Rapid Diagnosis of Canine Brucellosis*. Am. J. Vet. Res., 35 (7): 905-908.

- 30- George L.W. et.al. (1979). *Semen examination in dogs with canine brucellosis*. Am. J. Vet. Res., 40 (11): 1589-1595.
- 31- Greene. C. E. (1993). *Enfermedades Infecciosas en perro y gatos*. Ed. Interamericana MacGraw-Hill. Secc. III. Infecc. Bacterianas. Brucelosis Canina. Carmichael L. E.: 604-616.
- 32- Higgins R. (1979). *A serological survey for Brucella canis in dogs in the Province of Quebec*. Can. Vet. J., 20: 315-317.
- 33- Hollett R. B. (2006). *Canine brucellosis: Outbreaks and compliance*. Theriogenology 66: 575-587.
- 34- Johnson C.A. (1992). *Clinical signs and diagnosis of Brucella canis infection*. Comp. Cont. Ed. Prac. Vet., 14 (6): 763-772
- 35- Jones L. M. (1968). *Taxonomic position in the genus Brucella of the causative agent of canine abortion*. J. Bact., 95: 625-630
- 36- Keid L. B. (2007) *.A polymerase chain reaction for the detection of Brucella canis in semen of naturally infected dogs*. Theriogenology 67: 1203-1210.
- 37- Kim JongWan. (2007). *Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of Brucella canis*. J. Vet. Med. Sci. 69 (11): 1103-1107.
- 38- Kim Suk, Lee DongSoo, Suzuki, H., Watarai M. (2006). *Detection of Brucella canis and Leptospira interrogans in canine semen by multiplex nested PCR*. J. Vet. Med. Sci. 68 (6): 615-618
- 39- Kimura, M.; Imaoka, K.; Suzuki, M.; Kamiyama, T.; Yamada, A. (2008). *Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis*. J. Vet. Med. Sci. 70 (7): 707-709

- 40- Kirk R. W., Bonagura J. D. (1994). *Terapéutica Veterinaria en Pequeños Animales*. Interamericana Mc. Graw-Hill. Secc. 13. Enfermedades Oftalmológicas. Kern T.: 1177 – 1181.
- 41- Léone A.C. (2000). *La Brucellose canine à Brucella canis: une maladie protéiforme*. These Ec. Nat. Vet. Toulouse, N° 4067, p. 128.
- 42- Lucero N.E. (2002). *Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of Brucella canis infection in dogs*. J. Med. Microb. 51: 656-660
- 43- Madigan M. (2009). *Brock. Biología de los Microorganismos*. 12a Ed. Cap. 15. Dominio Bacterias: las proteobacterias: 442-443.
- 44- Malek dos Reis C., Hoffmann R. (2008). *Pesquisa de anticorpos anti-Brucella canis e anti-Brucella abortus em caes errantes da cidade de Sao Joao da Boa Vista, Estado de Sao Paulo, Brasil*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., Sao Paulo, 45 (1): 32-34.
- 45- Martino P., Carballo J., Malet A., Taroco J. (1983). *Brucelosis Canina: Estudio serológico de una población*. 1ª Jornadas Técnicas Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay. p. 38-39.
- 46- Megid J., Paes A., Moraes C., Marcos Jr., Fava N., Agottani. (1997). *Avaliação da prova de imunodifusão em Agar Gel no diagnóstico da Brucelose canina*. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinaria Conbravet. Gramado. Brasil. p. 308.
- 47- Megid J., Brito A.F., Moraes C.C.G., Fava N., Agottani J. (1999). *Epidemiological assessment of canine brucellosis*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Belo Horizonte. 51 (5) : 94-98.

- 48- Miranda, A. O., Báez, E. N. (2005). *Serodiagnóstico en Brucelosis Canina: Análisis comparativo entre las técnicas de aglutinación rápida en placa e inmunodifusión en gel de agar*. XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas 2005. 85° Aniversario - Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Nordeste: 67.
- 49- Moore J.A. (1967). *A previously undescribed organism associated with canine abortion*. Vet. Rec., 80, (20): 604-605
- 50- Moore J. A. (1969). *Male Dogs Naturally Infected with Brucella canis*. JAVMA 155 (8): 1352-1358.
- 51- Ramírez L., Hernán,Calle E., Sonia,Echevarría C., Luisa,Morales C., Siever. (2006). *Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao*. Rev. Inv. Vet. del Perú. 17 (1): 39-43.
- 52- Saegusa J. (1978). *A survey of Brucella canis infection in dogs from Tokyo area*. J. Vet. Sci., 40: 75-80.
- 53- Stanchi N. O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Ed. Intermédica. Bs. As. Argentina. p. 572.
- 54- Thanappa M. (1991). *Serological and bacteriological detection of Brucella canis infection of dogs in Madras*. Indian Vet. J., 68: 399-401.
- 55- Wanke M. M. (2000). *Determinación de anticuerpo contra proteínas citoplasmáticas de Brucella por ELISA para la detección de casos crónicos de Brucelosis canina*. Sel. Vet. 8 (3): 308-310.