

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia de *Brucella canis* en caninos del
distrito de Pucusana**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Magali I. Zavala Carlos

ASESOR

Siever Morales Cauti

Lima - Perú

2011

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo con todo el amor que puedo darles a mi Familia, principalmente mis Padres, por su sacrificio y esfuerzo, por permitirme tener una carrera y siempre apoyarme desde cuando de muy pequeña les dije que quería curar a los animales. Aun así hayamos pasado momentos difíciles siempre me han brindado su comprensión, cariño y amor. Los llevaré siempre conmigo vaya donde vaya.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco al Señor, que me permite ver la luz del día cada día, que permitió en mi camino poder seguir mi vocación y convertirme en la profesional que soy ahora.

Agradezco a mi Padre por siempre despertar en mí el amor de toda criatura de la naturaleza y alentarme a seguir mi vocación, a mi Madre por siempre cuidar de mí, de su preocupación día a día sobre todo durante el desarrollo universitario y nunca dudar de mis capacidades; a ambos por su apoyo económico que me hizo posible seguir una carrera universitaria. A mis hermanos por apoyarme constantemente e incondicionalmente.

Agradezco sinceramente a mi asesor de Tesis, Dr. Siever Morales Cauti, su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia para conmigo, su santa paciencia y motivación han sido fundamentales para el desarrollo de la presente tesis. Me queda un sentimiento de deuda inmensa con él por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta Tesis, desde que se presentó como proyecto hasta su publicación.

Agradezco también inmensamente a esta Casa de Estudio de la cual me siento orgullosa de pertenecer: Sanmarquina eternamente.

Índice de contenido

Resumen ix

Summary x

Lista de Cuadros, Figuras y Tablas xi,xii,xiii

I.	
INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN	
BIBLIOGRÁFICA	4
1. Aspectos históricos de la brucelosis	4
2. Características del agente etiológico	5
2.1 Etiología.....	5
2.2 Morfología.....	6
2.3 Cultivo.....	6
2.3.1 Medios de Cultivo.....	7
2.4 Propiedades bioquímicas y metabólicas.....	7
2.5 Características antigénicas.....	11
2.6 Genética	15
2.7 Sensibilidad a los desinfectantes.....	17
3. Epidemiología	17
3.1 Distribución mundial.....	18
3.2	
Transmisión.....	18
3.2.1 Transmisión directa.....	18
3.2.2 Transmisión indirecta.....	19
3.2.3 Vías de eliminación.....	20
3.3 Especies susceptibles.....	21
3.3.1 Infección natural.....	21
3.3.2 Infección experimental.....	21
3.3.3 Animales silvestres susceptibles.....	21

3.4 Incidencia y prevalencia.....	22
4. Patogenia.....	24
5. Signología.....	27
5.1 Período de incubación.....	27
5.2 Signos clínicos.....	27
5.2.1 Hembras.....	27
5.2.2 Machos.....	29
5.2.3 Signos no específicos.....	29
5.2.4 Otros signos.....	30
5.2.4.1 Discoespondilitis.....	30
5.2.4.2 Lesiones cutáneas.....	30
5.2.4.3 Dermatitis escrotal.....	31
5.2.4.4 Prostatitis.....	31
5.2.4.5 Uveítis anterior.....	31
5.2.5 Curso.....	32
6. Hallazgos histopatológicos.....	32
6.1 Hembras.....	33
6.2 Machos.....	33
6.3 Fetos.....	36
7. Diagnóstico.....	36
7.1 Diagnóstico clínico.....	36
7.2 Examen de semen (espermatografías).....	37
7.3 Diagnóstico serológico.....	37
7.3.1 Prueba de aglutinación en tubo (TAT).....	39
7.3.2 Prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT)(2ME-RSAT).....	39
7.3.3 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).....	40
7.3.4 ELISA.....	42
7.3.5 Prueba de anticuerpo fluorescente indirecto (IFAT).....	43
7.4 Diagnóstico bacteriológico.....	45
7.4.1 Aislamiento.....	46
8. Diagnóstico diferencial.....	49
8.1 Linfadenopatía.....	49
8.2 Transtornos relacionados con aborto.....	50
8.2.1 Traumatismos.....	50
8.2.2 Inanición o desnutrición de la madre.....	50

8.2.3	
<i>Toxoplasmosis</i>	50
8.2.4 <i>Hepatitis</i>	
<i>canina</i>	50
8.3 <i>Infertilidad en la hembra</i>	50
8.3.1 <i>Reabsorción</i>	
<i>fetal</i>	50
8.3.2 <i>Endometritis</i>	
<i>bacteriana</i>	50
8.3.3 <i>Vaginitis</i>	
<i>bacteriana</i>	50
8.3.4	
<i>Hormonales</i>	51
8.4 <i>Infertilidad en el macho</i>	51
8.4.1	
<i>Hormonales</i>	51
8.4.2	
<i>Genéticos</i>	52
8.4.3 <i>Orquitis y epididimitis</i>	52
9. Pronóstico	52
10.	
Tratamiento	52
11. Inmunidad y prevención	57
12. Control	58
13. Implicancia en salud pública-la enfermedad en el hombre	62
14. Repercusión económica	64
III. MATERIALES Y	
MÉTODOS	65
1. Lugar de estudio	65
2. Animales y obtención de información	66
3. Muestreo	66
4. Equipos, materiales y reactivos	66
5. Tamaño muestral	68
6. Prueba utilizada	68
6.1 <i>Preparación gel de agar</i>	69
6.2 <i>Técnica de la prueba de IDGA</i>	69
7. Análisis de datos	70
7.1 <i>Prevalencia</i>	70
7.2 <i>Intervalo de confianza</i>	70
7.3 <i>Análisis de variables</i>	71
IV RESULTADOS Y	
DISCUSIÓN	72

V	
CONCLUSIONES.....	
78	
VI LITERATURA	
CITADA.....	79
Anexos.....	91

RESUMEN

202 sueros sanguíneos de perros residentes en el distrito de Pucusana fueron objeto de investigación para aplicar la técnica de Inmunodifusión en gel de agar y detectar seroprevalencia a anticuerpos contra *Brucella canis* en el distrito de Pucusana. Las muestras se tomaron entre los meses de enero, febrero y marzo del 2009 respectivamente, y procesadas en el Laboratorio de Micología y Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Del total de muestras sometidos al estudio, 21.28 % (43/202) mostro ser positiva a la prueba de IDGA con un IC de 2.88%. De las variables que se consideraron

en el presente estudio, sólo se encontró asociación estadística significativa en la correspondiente a sexo; esto se explica porque en el estudio la mayor cantidad de animales fueron machos en comparación de las hembras; en los machos $16.80\% \pm 3.34\%$ (21/125) y en las hembras es de $28.57\% \pm 5.14\%$ (22/77).

De estos resultados se desprende que la prevalencia encontrada es más alta que la que se encontró en los Distritos de Bellavista y Callao en el 2005 ($15.57\% \pm 3.33\%$) por lo que esta prevalencia representa un indicador de riesgo de la salud de la población expuesta.

Palabras claves: perros, seroprevalencia, brucelosis canina, *Brucella canis*, IDGA, zoonosis, Pucusana.

ABSTRACT

202 samples of blood serum from dogs residing in the Pucusana district were tested as part of a study that used the Agar Gel Immunodiffusion Test in order to detect the seroprevalence of *Brucella canis* antibodies in that area. The samples were collected between the months of January, February and March, 2009 and processed in the Veterinary Bacteriology and Mycology Laboratory in the Veterinary Science Department at Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Out of the total number of samples, 21.28 % (43/202) tested positive by AGID, with a 2.88% CI. From the variables considered in the study, only the variable of sex showed a significant statistical relationship due to the higher number of male dogs in the study: 16.80% \pm 3.34% (21/125) in male dogs, compared to 28.57% \pm 5.14% (22/77) in female dogs. These results show that the prevalence found in Pucusana is higher than the prevalence found in the Bellavista and Callao districts in 2005 (15.57% \pm 3.33%), and that it poses a health risk to the population exposed.

Key words: dogs, seroprevalence, canine Brucellosis, *Brucella canis*, AGID, Zoonosis, Pucusana

Lista de Cuadros

	Pág.
Cuadro 1A. Características diferenciales de algunas especies de <i>Brucella sp.</i>	8
Cuadro 1B. Características Diferenciales de algunas especies de <i>Brucella sp.</i>	9
Cuadro 2. Características de <i>Brucella canis</i>	10
Cuadro 3. Clasificación especies del género <i>Brucella</i>	16
Cuadro 4. Efectos de la brucelosis canina sobre índices reproductivos	28
Cuadro 5. Signos clínicos sobresalientes en la brucelosis canina	32
Cuadro 6. Pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de <i>Brucella canis</i>	44
Cuadro 7. Órganos utilizados para aislar <i>B. canis</i>	45
Cuadro 8. Diagnóstico de confirmación a infección por <i>B. canis</i> a través de un cultivo	48
Cuadro 9. Enfermedades que cursan con linfadenopatía generalizada	49
Cuadro 10. Efectividad de algunos esquemas terapéuticos	55
Cuadro 11. Quimioterapia de la brucelosis canina.	56
Cuadro 12. Estrategias de control para la brucelosis canina	61

Lista de Figuras

Pág.

10

Figura 1. Prevalencia y distribución de <i>B. canis</i> en diferentes países.	23
Figura 2. Patogénesis de la brucelosis canina.	26
Figura 3. Túbulos seminíferos con predominio de células de Sertoli y ausencia de desarrollo de la línea germinativa. Compartimento intersticial con presencia de células de Leydig de apariencia normal.	35
Figura 4. Túbulos seminíferos con abundantes células de Sertoli con citoplasma finamente granuloso, desarrollo incompleto de la línea germinativa, escasos espermatocitos I, presencia de grandes vacuolas en el epitelio. En el lumen se observan células descamadas apoptóticas y de macrófagos, cargados con pigmentos tipo hemosiderina.	35
Figura 5. Túbulos seminíferos 1, presencia de glóbulos rojos y blancos en el lumen y células descamativas del epitelio, vacuolización de algunos segmentos epiteliales, engrosamiento parcial del peritúbulo.	36
Figura 6 y 7. Realización Prueba IDGA	70

Lista de Tablas

Tabla 1. Procedencia y número total de animales muestreados en el distrito de Pucusana.

Pág. 73

Tabla 2. Distribución de animales muestreados por sexo y su resultado en la prueba de IDGA.

Pág. 73

Tabla 3. Distribución de los animales por raza, positivos a la prueba de IDGA.

Pág. 74

Tabla 4. Distribución de los animales por su historial reproductivo y su positividad a la prueba de IDGA.

Pág. 75

Tabla 5. Distribución de los animales por sus hábitos de salida a la calle y su positividad a la prueba de IDGA.

Pág. 76

Tabla 6. Asociación de las variables raza, edad, historia reproductiva (abortos) y sexo con la positividad a la prueba (IDGA), mediante la prueba de Ji-cuadrado ($p < 0.05$).

Pág. 77

Lista de Anexos

Anexo 1. Mapa Satelital de Pucusana

Pág. 92

Anexo 2. Formato de Encuesta

Pág. 93

I. INTRODUCCIÓN

Los primeros informes sobre brucelosis canina aparecen en 1966 en un grupo de perros de raza beagle en los Estados Unidos, en los cuales ocurrían brotes severos de aborto epizoótico

(Carmichael, 1968). Desde entonces este microorganismo se ha aislado de muestras de perros en casi todos los estados de Estados Unidos (Reike y Rhoades, 1975) y en muchos otros países, incluyendo Japón, Alemania, Brasil, Checoslovaquia; Madagascar, México y Argentina (Ueda *et al.*, 1974; Flores y Segura, 1975; Verger *et al.*, 1975). En los últimos 25 años se ha producido en varios países, un notorio incremento en el número de criaderos de perros, en los que existen sistemas adecuados para el registro de producción. Esto ha propiciado la identificación de enfermedades que hasta entonces habían pasado desapercibidas; tal es el caso de la infección causada por *Brucella canis* (*B. canis*).

Además, existen evidencias serológicas de la infección en Perú (Englehardt, 1974) y Túnez (El Bahri *et al.*, 1970). Estudios serológicos realizados en Japón demostraron que la infección ocurre tanto en los perros de criaderos como en los perros callejeros, encontrando en Tokio una prevalencia aproximada de 3.6% (Ueda *et al.*, 1974). Los diferentes estudios realizados en Estados Unidos revelaron cifras que fluctúan entre 1 y 6% de prevalencia, siendo ésta mayor en el sur del país (Spink y Morisset, 1970; Hoff y Schneider, 1975).

En nuestro país se encontró evidencia serológica de esta enfermedad, en estudios realizados por Reyes (1977) y Ramírez (2005), donde se encontraron un 28% de perros seropositivos en Lima Metropolitana y 15.57% en los distritos de Bellavista y Callao respectivamente.

La brucelosis en el canino, es causada específicamente por la especie *B. canis*, y se caracteriza por inducir una patología de carácter reproductivo en los animales, aún cuando *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* pueden infectar esporádicamente al animal, causándole un cuadro autolimitado (Carmichael, 1990; Carmichael y Greene, 1993). *B. canis* es eliminada principalmente durante el aborto, presentando gran cantidad de microorganismos en el tejido fetal abortado y en las descargas vaginales. Así mismo, en el macho infectado se elimina a través de la orina y el semen.

La brucelosis canina es una enfermedad que termina con la vida reproductiva del perro y es causa de aborto en hembras; *B. canis*, sólo afecta el útero de hembras grávidas, coloniza las células epiteliales de la placenta dando como resultado muerte embrionaria o muerte fetal, a veces la perra lleva a término la gestación y los cachorros nacen vivos y débiles, los cuales mueren en poco tiempo. Las hembras que no están gestantes, por lo general no presentan signos de enfermedad, pero eliminan el organismo a través de la orina, o secreciones vaginales por mucho tiempo (Johnson y Walker, 1992; Rodríguez *et al.*, 1994). La bacteria penetra al huésped por medio de la mucosa oro-nasal, conjuntiva, genital, así como por aerosol y fómites; sin embargo, la bacteria es susceptible a desinfectantes como el amonio cuaternario y los compuestos yodóforos (Luna, 1991; Johnson y Walker, 1992; Mateu y Castillo, 1993).

En 1992, Villalba *et al.* determinaron que *B. canis* provoca una respuesta hematológica en la que los mononucleares y polimorfonucleares (neutrófilos) son las principales células reaccionantes; es bien conocida la destacada respuesta celular de esta infección, con proliferación de linfocitos y monocitos como mecanismos de defensa para la lenta destrucción intracelular de las brucelas. En la fase aguda (3-4 semanas), se observa una leucocitosis muy marcada, posteriormente, los recuentos disminuyen a los 2.5 o 3 meses de infección, evidenciando una marcada leucopenia.

En Japón, varios investigadores han demostrado la alta frecuencia de *B. canis* a partir de aislamientos de la orina en machos; en 1979, Serikawa y Muraguchi mostraron la probable transmisión de la bacteria por orina en cachorros después de varias semanas de cohabitación con machos adultos infectados, así como la continua eliminación de grandes cantidades de brucelas en la orina de machos infectados. Así mismo, se ha estimado la dosis mínima de infección por vía oral para perros la cual es de 2×10^6 microorganismos/mL. Los fluidos vaginales después de un

aborto contienen más de 10^{10} microorganismos/mL de *B. canis* durante varias semanas, encontrando en orina hasta 10^3 microorganismos/mL (Carmichael y Joubert, 1988).

La falta de signos específicos hace necesario recurrir al diagnóstico de laboratorio para confirmar la sospecha clínica. (Mateu y Castillo, 1993). Debido a su practicidad, las pruebas serológicas son las más usadas para el diagnóstico de la infección por *B. canis* en perros. Sus ventajas en relación al aislamiento bacteriano son: facilidad en ejecución, rápido procesamiento y la posibilidad de examen de un número considerable de muestras. La desventaja es que, ocasionalmente, la mayoría de las pruebas no son específicas para *B. canis* y pueden dar resultados falso-positivos. Por otro lado, el cultivo bacteriano refuerza un diagnóstico definitivo cuando la bacteria es aislada; sin embargo, es un procedimiento bastante tedioso, toma tiempo y puede dar resultados falso-negativos (Santos *et al.*, 2004).

Se ha demostrado *in vitro* que *B. canis* es sensible a sulfonamidas, oxitetraciclina, ampicilina, gentamicina, eritromicina y particularmente sensible a penicilina-estreptomicina; sin embargo, *In vivo*, si bien es cierto que la bacteremia desaparece durante la administración de la terapia antibiótica, ésta reaparece nuevamente una vez terminado el tratamiento (Jennings *et al.*, 1974).

Además de la importancia zoonótica de esta enfermedad (C.D.C., 1978; Sánchez *et al.*, 2000), se le reconoce como una entidad que produce importantes pérdidas económicas en los criaderos, como consecuencia de las alteraciones reproductivas. Además el riesgo sanitario al que se enfrenta el hombre, correspondiendo a personas que están en contacto con animales infectados por *B. canis*, propietarios, veterinarios y en algunos casos las consecuencias de accidentes de laboratorio; por lo que no debemos olvidar su potencial poder patógeno para el hombre y otros animales. (Martín *et al.*, 1992; Villalba *et al.*, 1992). En tal sentido, la brucelosis canina constituye en la actualidad un problema mundial difícil de afrontar, tanto para la población humana como para la población canina, ya que las manifestaciones clínicas son casi inaparentes, sobre todo en animales fuera de la etapa reproductiva, siendo considerada una zoonosis de fácil difusión y de difícil diagnóstico clínico.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estimar la seroprevalencia a *B. canis* mediante la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar en caninos del distrito de Pucusana, departamento de Lima.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Aspectos históricos de la brucelosis

La descripción más antigua de la enfermedad fue hecha por Hipócrates, en el año 377 antes de Cristo. En la isla de Malta en 1887 un médico de la armada británica, David Bruce, aisló del bazo de cuatro soldados fallecidos una bacteria que llamó "*Micrococcus melitensis*", en honor al antiguo nombre romano de la isla. Actualmente se conoce como *Brucella melitensis*. En el año 1897, Bang y Stribolt, profesores de la Escuela Superior de Veterinaria de Copenhague, aislaron y describieron, por primera vez, un microorganismo obtenido de fetos y anexos fetales de vacas, al que denominaron "*Bacillus abortus*", estableciendo la etiología del "aborto infeccioso" en el ganado bovino. En 1905 el médico maltés Zammit, comprobó que los productos lácteos no pasteurizados o hervidos, provenientes de cabras infectadas, eran la fuente de infección para el hombre (Crespo León, 1994). En 1914, Traum aisló una nueva especie de *Brucella* a partir de fetos porcinos. El microorganismo se parecía, morfológica y culturalmente a *B. abortus*, pero difería en algunas características bacteriológicas, siendo denominado "*American melitensis*", actualmente *B. suis* (Crespo León, 1994).

Evans, en 1918 confirmó experimentalmente las estrechas relaciones taxonómicas existentes entre *B. abortus* y *B. melitensis* (Orduña *et al.*, 2001a).

En 1920, Meyer y Show, crearon el género *Brucella*, que incluía dos especies: *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*, años más tarde se anexó *Brucella suis* (Lucero, 1996).

En el año 1953 se aisló una nueva especie, que se denominó *Brucella ovis*, a partir de un proceso patológico conocido como epididimitis contagiosa del carnero. En 1957 Stoenner y Lackman aislaron la quinta especie de este género de la rata del desierto, *Neotomae lepidae*, en el oeste de EEUU, que se denominó *Brucella neotomae*. Esta última fue aceptada como especie, pero *B. ovis* debió esperar 18 años para ser reconocida (Lucero, 1996). En 1966 en EEUU Carmichael y Bruner, aislaron de fetos caninos de raza Beagle, una nueva especie conocida como *Brucella canis* (Carmichael, 1966; Crespo León, 1994; Lucero, 1996).

Entre 1994 y 1996, Ewalt y Ross, describieron otra especie, que llamaron *Brucella maris*. Entre los animales afectados se encuentran pinnípedos, cetáceos y nutrias, de los cuales, en algunos casos se ha cultivado la bacteria y en otros, solo se ha detectado respuesta humoral. Según al hospedero al que infectan se clasifico en 2 serotipos: *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* (Ross *et al.*, 1996; The Center for Food Security and Public Health, 2007a). Esa nueva especie sería capaz de producir abortos en las especies de mamíferos marinos afectados, al igual que otros microorganismos pertenecientes a ese género (Ewalt *et al.*, 1994; Blank *et al.*, 2002). Los estudios genómicos llevados a cabo en cepas de origen marino y las especies clásicas terrestres demuestran que son diferentes (Orduña *et al.*, 2001b). En el 2000 se aisló una bacteria en roedores conocidos como topillos campesinos (*Microtus arvalis*) en el sur de Moravia, Republica Checa llamándola más tarde *B. microti* (Scholz *et al.*, 2008).

En el continente americano no se puede establecer con exactitud la aparición de la enfermedad. Algunos autores consideran que los orígenes de la brucelosis se remontan a la época de la conquista y que pudo ingresar a América con los animales domésticos importados de España y de otros países europeos (García Carrillo, 1987).

2. Características del agente etiológico

2.1 Etiología

Recibió el nombre de *Brucella* en 1920 en honor al Australiano David Bruce, especialista en enfermedades tropicales quien sirvió al ejército británico. En 1887, Bruce aisló este organismo del bazo de un soldado quien murió en Malta, llamándola así “fiebre de Malta”, más tarde se encontró *Brucella* en otros animales domésticos (Freer y Castro-Arce, 2001).

A partir de 1963, se observa una infección en un criadero de perros; sin embargo, la epidemia no es perceptible sino hasta 1964-1965, lo que conduce a realizar estudios de laboratorio. Los exámenes bacteriológicos y serológicos indican que el organismo es apto para clasificarlo dentro del género *Brucella*: es decir, estudios sobre antígenos solubles obtenidos por tratamiento ultrasónico y examinados por inmunoelectroforesis y prueba de difusión en gel, mostraron una identidad cercana de las reacciones del agente con otros miembros del género *Brucella* pero no con otras especies gram negativas dentro de las misma familia *Brucellaceae* (Carmichael, 1968).

Carmichael y Bruner (1968), fueron los primeros en proponer el nombre de *Brucella canis*, quienes a su vez, encontraron que posee las características comunes de las otras especies del género *Brucella* mostrando propiedades morfológicas, bioquímicas y metabólicas muy similares a *Brucella suis*, y antigénicamente es similar a *Brucella ovis* (Margaret, 1969; Carmichael, 1978). Finalmente en 1970 es reconocida como especie por el subcomité en taxonomía (Luna, 1991).

2.2 Morfología

B. canis es una bacteria que se localiza intracelularmente, bacilo corto (cocobacilo) de 0.5 a 0.7 μm por 0.5 a 1.5 μm , gramnegativo, inmóvil, no esporulado y aerobio estricto (Carmichael y Greene, 1993). No presentan cápsula ni coloración bipolar y carecen de flagelos, fimbrias, exotoxinas, plásmidos o fagos lisogénicos, y su lipopolisacárido (LPS) posee menor actividad endotóxica que el hallado en otras bacterias gram negativas (Lucero, 1996-2004; Moreno y Moriyón, 2001; Moriyón *et al.*, 2001). Tienen metabolismo respiratorio y un sistema citocromo basado en el transporte de electrones, con oxígeno o nitrato como aceptor terminal (Lucero, 1996).

2.3 Cultivo

Crece en una temperatura óptima de 37 °C en agar triptosa, agar brucela, agar Thayer Martin modificado o Ruiz Castañeda con un pH de de 6.7-7.4 (Mota, 1998); produce un crecimiento blanco-grisáceo el cual es visible pasadas 36-48 horas, a partir del día 5-7, cambia a una forma mucoide la cual se adhiere a la superficie del agar (Carmichael, 1968; Carmichael y Bruner, 1968); si éstas no son visibles dentro de este tiempo y no muestran tener crecimiento, se guardan por 3 ó 4 días antes de ser descartadas como negativas, las colonias son pequeñas, generalmente miden 1 a 1.5 mm (Carmichael, 1967; Carmichael, 1968; Carmichael, 1978; Flores y Carmichael; 1975). No requiere la presencia de CO₂ para su crecimiento, los cultivos frescos de *Brucella canis* son siempre rugosos (R) como consecuencia de la carencia de la cadena “O” del lipopolisacárido (LPS) (American Society for Microbiology, 1991; National Center for Infectious Diseases y Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Las colonias poseen apariencia finamente granular. Esto se puede observar utilizando una luz transmitida oblicuamente. Cuando se cultiva en caldo Albimi, el crecimiento adquiere aspecto acordonado (Flores y Carmichael, 1986). Se puede teñir con Ziehl-Neelsen modificada y Koster, observándose una tonalidad rojo anaranjada sobre un fondo azul (Briseño, 1990).

2.3.1 Medios de Cultivo

Se han encontrado satisfactoriamente para el cultivo de *Brucella canis* los medios generales como son el agar y caldo tripticosa soya, el agar y caldo triptosa, así como también los medios selectivos con inhibidores de contaminantes como son el agar Thayer Martin, el agar Ruiz Castañeda, el agar Kuzdas y Morse, el agar o caldo Brucella Albimi, utilizándose como inhibidores suplementos antibióticos como: bacitracina 25,000 U, polimixina B 4,500 U, eyeloexamida 100 mg (Carmichael, 1968).

2.4 Propiedades bioquímicas y metabólicas

B. canis posee propiedades bioquímicas similares a las de *B. suis*, biotipos 3 y 4 (Morgan y Corbel, 1975), razón por la cual diferentes autores han sugerido que este microorganismo sea considerado como un biotipo más de *B. suis* en lugar de ser incluido como una especie diferente. Una notable diferencia es la característica mucóide de *B. canis*. La inclusión de esta bacteria dentro del género *Brucella* se vio favorecida por los estudios de su ácido desoxiribonucleico (ADN), los que mostraron homologías en sus bases Guanina - Citosina similares a los otros miembros del género (Hoyer y McCullough, 1968).

La capacidad de las brucelas de crecer o ser inhibidas por cantidades variables de fucsina básica o tionina es característica importante para la identificación preliminar de las diferentes especies del género y sus respectivos biotipos. En investigaciones realizadas en la Universidad de Cornell se encontró que de 30 cepas de *B. canis* estudiadas, 5 fueron capaces de crecer en medios que contenían fuertes concentraciones de fucsina básica (Cuadro 1A), mientras que la cepa internacional de referencia (cepa RM6-66) y los otros 24 cultivos fueron totalmente inhibidos por este colorante. Además, en estudios de metabolismo oxidativo se observó que algunas de estas cepas utilizaron eritritol, el cual no es utilizado por la cepa de referencia. En un artículo publicado por Verger *et al.*, (1975), describen el aislamiento de una cepa (D519) que también fue resistente a la fucsina básica y utiliza eritritol. Esto sugiere la posibilidad de que existan por lo menos 2 diferentes biotipos de *B. canis*; sin embargo, faltan aún más pruebas para poder llegar a esa conclusión.

B. canis requiere biotina, niacina, tiamina, pantotenato de calcio y trazas de magnesio para su crecimiento (Boffil *et al.*, 1989), produce H₂S, catalasa y oxidasa positiva, hidroliza úrea, reduce nitratos a nitritos, citrato negativo, rojo de metilo negativo, prueba Vogues-Proskawer negativo y no producen indol (Cuadros 1B y 2) (American Society for Microbiology, 1991). Es susceptible a sufrir lisis por el fago Tb y capacidad de aglutinar sueros monovalentes A, M o anti-R (Alton *et al.*, 1975).

Cuadro 1A. Características Diferenciales de algunas especies de *Brucella* sp.

Crecimiento en medios con:						
Especie	Tionina			Fucsina básica		Lisis por el fago
	a	b	c	b	c	DRP 10000 X DRP

<i>Brucella melitensis</i>	-	+	+	+	+	-	-
<i>Brucella abortus</i>	-	-d	-d	+	+	+	+
<i>Brucella suis</i>	+	+	+	-d	-d	-	+
<i>Brucella neotomae</i>	-	-	+	-	-	-	+
<i>Brucella ovis</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Brucella canis</i>	+	+	+	-	+-	-	-

a Colorante en concentración 1: 25 000.

DRP Dosis de rutina para prueba.

b Colorante en concentración: 1: 50 000.

c Colorante en concentración 1: 100 000.

d Algunos biotipos positivos.

Fuente: Flores y Carmichael, 1981

Cuadro 1B. Características diferenciales de algunas especies de *Brucella sp.*

<i>Especie</i>	<i>Requerimiento Co₂</i>	<i>Produccion H₂S</i>	<i>Produccion ureasa</i>
<i>B. melitensis</i>	-	-	<i>Variable</i>
<i>B. abortus</i>	<i>+a</i>	<i>+b</i>	++
<i>B. suis</i>	-	++b	+++
<i>B. neotomae</i>	-	+	+++

<i>B. ovis</i>	+	-	-
<i>B. canis</i>	-	+	++++

a Algunos biotipos no requieren CO₂ *b* Algunos biotipos no producen H₂S.

Fuente: Flores y Carmichael, 1981

Cuadro 2. Características de *Brucella canis*

Prueba		Resultado
Apariencia colonial		Rugosa
Motilidad		-
Fermentación de carbohidratos		-
Utilización de citrato		-
Producción de urea		++++
Producción de catalasa		++++
Producción de oxidasa		+
Producción de H ₂ S		+
Reducción de nitratos		+
Indol		-
Crecimiento en Mc-Conkey		-
Crecimiento en fucsina básica	1:50,000	-
	1:100,000	+++
Tionina	1:25000	++
	1:50,000	++++

Requerimiento de CO2	-
Aglutinación con acriflavina	+
Cristal violeta	+
Hemólisis	-
Lactosa	-
Dextrosa	-
Rojo de metilo-Voges Proskawer	-
Licuefacción de gelatina	-
<i>Metabolismo oxidativo</i>	Resultado
<i>Substrato</i>	
D-alanina	+
L-alanina	-
L-aspargina	-
Ac. L-glutámico	+
D, L-ornitonina	+
D, L-citrulina	+
L-arginina	+
L-lisina	+
L-arabinosa	+
L-galactosa	+
D-galactosa	+
D-ribosa	±
D-glucosa	+
Eritritol	-

Fuente: Flores y Carmichael, 1986; Briseño, 1990; Corro, 1994; Valdivia et al., 1994

Se tiene conocimiento de la existencia de una variante de laboratorio de aspecto mucoide (M), conocida como cepa RM38S, ésta posee mayor actividad antigénica y patogénica que la cepa RM-666, que corresponde a la cepa tipo de *B. canis* (Flores y Carmichael, 1986).

Carmichael y Bruner en 1968, describieron una cepa variante (M-) de característica lisa-mucoide de *B. canis* obtenida después de varios pases de la cepa de referencia RM-666 en caldo triptosa y medio agar glicerol-glucosa. Las colonias de la variante M- son menos granulosas que las de la cepa de referencia y no tienden a adherirse a la superficie del agar, aun después de varios días de incubación. El crecimiento en caldo es uniforme durante seis días.

Experimentalmente, se ha encontrado que la variante M- es poco aglutinogénica y de baja patogenicidad ya que no produjo abortos en hembras preñadas, ni causó enfermedad en el tracto genital de los machos infectados, es decir, es menos virulenta que la cepa de referencia RM-666 (Flores y Carmichael, 1975).

Por medio de la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) e inmunoelectroforesis, se encontró que existe reacción cruzada entre *B. canis* y otros miembros del género *brucella* (*B. abortus* 45/20, *B. ovis*), y ciertas especies de bacterias como *Actinobacillus sp.* (Carmichael, 1978), *Bordetella bronchiséptica* y *Moraxella sp.* (Briseño, 1990).

En cuanto a la estructura antigénica rugosa, es similar a *B. ovis* lo que ocasiona una reacción cruzada con esta bacteria. La diferencia que existe entre *B. canis* con *B. abortus* y *B. melitensis*

es que *Brucella canis* no posee antígenos lisos (O) ni la endotoxina asociada a este tipo de *brucelas* (Briseño, 1990).

2.5 Características antigénicas

La estructura más característica de las bacterias gram negativas es su envoltura celular, formada por una membrana citoplasmática, una capa de peptidoglicanos, un espacio periplasmático intermedio rico en proteínas solubles y una membrana externa (Moriyón *et al.*, 2001). Esta última constituye, sin duda, la estructura de mayor interés desde el punto de vista taxonómico, epizootiológico, antigénico, inmunológico, de diagnóstico y patogénico, todo ello en razón de su particular composición química y estructural. Dicha membrana, al estar desprovista de cápsula, se encuentra en contacto directo con el medio, y contiene en su superficie los componentes antigénicos más importantes (antígenos de superficie) (Crespo León, 1994).

La membrana citoplasmática consta de una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos, con ácidos grasos formando unidades hidrofóbicas y gliceroles como unidades hidrofílicas. Luego, la pared rígida de peptidoglicano, formada por dos derivados de azúcares: N-acetilglucosamina y N-acetil murámico (Ramis, 2000), responsables de la forma e integridad osmótica de la bacteria. El espacio periplasmático contiene enzimas, algunas de las cuales detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes y enzimas sobre las que actúan los antibióticos β -lactámicos. La membrana externa (ME), separada de la pared de peptidoglicano por el espacio periplasmático, es la barrera entre la bacteria y el medio ambiente, la primera en entrar en contacto con el sistema inmune del hospedero (Lucero, 1996).

Contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y LPS. La simetría en la distribución del LPS, junto con sus propiedades y las de las proteínas que actúan como poros en la membrana externa (porinas), hace que actúe como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos (Moriyón *et al.*, 2001). (Figura. 1)

La envoltura celular del género *Brucella* presenta algunas diferencias con la membrana externa de otros gramnegativos (enterobacterias y pseudomonas). Es relativamente permeable a agentes hidrófobos como colorantes, detergentes y sales biliarias, con diferencias entre especies y biotipos. Es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales y a otros policationes bactericidas como la polimixina B. Estas características se relacionan con ciertas propiedades de los componentes de la membrana externa. La envoltura de

Brucella contiene entre otros fosfolípidos, fosfatidil-colina, lo que es poco común en patógenos gram negativos, y lípidos de ornitina. Los fosfolípidos y el LPS poseen ácidos grasos de cadena más larga que lo habitual en los gram negativos típicos. Es posible que estas características se relacionen con la tinción positiva de las brucelas por el método de Stamp (ácido alcohol resistente modificado) (Moriyón *et al.*, 2001).

El LPS consta de una parte glucolípídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie, y otra polisacárida (polisacárido B) dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo y la cadena O. Las especies *B. ovis* y *B. canis* (especies rugosas) carecen de cadena O y otras que característicamente la poseen, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* (especies lisas), pueden perderla por mutación (mutantes rugosas o R) (Moriyón *et al.*, 2001). Sin embargo, el LPS-R de las mutantes rugosas y de *B. ovis* muestran sólo identidad parcial (Moriyón y Gamazo, 1990). La presencia de LPS-R, naturales o por mutación, hace que existan dos tipos diferentes de superficies celulares. Esta diferencia es importante, ya que las brucelas habitualmente patógenas para el hombre poseen LPS en fase lisa y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica (Moriyón *et al.*, 2001).

El lípidos A de *Brucella* está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β -hidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga. Como antígeno, el lípidos A no parece tener relevancia diagnóstica (Moriyón *et al.*, 2001).

No se conoce en detalle la estructura del núcleo del LPS, si bien se sabe que contiene 2-ceto, 3-desoxioctonato (KDO), glucosa, galactosa y quinovosamina, por la cual se une la cadena O. Las cepas rugosas carecen de quinovosamina y por lo tanto de dicha cadena (Blasco y Gamazo, 1994). El núcleo no posee heptosas ni fosfatos. Con anticuerpos monoclonales se han descrito dos epítomos en el núcleo (Moriyón *et al.*, 2001).

En la membrana externa (ME) de *B. ovis* y *B. canis* se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el LPS-R y las proteínas de membrana externa (PME). Ambos están expuestos en la superficie de la ME, presentando epítomos accesibles a los anticuerpos monoclonales, ya que carecen de gran parte de la cadena O del LPS presente en las cepas lisas. Esto ha sido comprobado mediante distintas técnicas como: ELISA sobre células enteras, microscopía electrónica y citometría de flujo (Bowden *et al.*, 1995).

El LPS-R es una molécula compleja y de bajo peso molecular, compuesto por el lípidos A y un núcleo o "core" constituido por oligosacáridos y KDO (2-ceto, 3-desoxioctonato). Existen varios datos que cuestionan la importancia del LPS de *Brucella* como determinante de

patogenicidad. En primer lugar, la principal diferencia estructural entre el LPS de las cepas L y R radica en que el LPS de las cepas R carece de gran parte de la cadena polisacárido O. El resto de la molécula, el lípido A y el núcleo de KDO, es idéntico en los LPS de ambas cepas, L y R; y es preciso tener en cuenta que la mayor parte de las propiedades biológicas del LPS reside en el lípido A. En segundo lugar, *B. canis* y *B. ovis*, ambas R, son patógenas (Orduña *et al.*, 2001b)

Las PME se asocian estrechamente con los LPS. Dentro de éstas se encuentran las proteínas mayores y menores, de acuerdo a su abundancia relativa. Las mayores se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1, de 88 a 94 kDa; posiblemente su función está relacionada con la biosíntesis de la propia envoltura (Moriyón *et al.*, 2001); grupo 2, de 36 a 38 kDa, son equivalentes a las porinas de otros gramnegativos; grupo 3, de 25 a 27 y de 31 a 34 kDa, las cuales están fuertemente asociadas al peptidoglicano (Cloeckaert *et al.*, 1999; Salhi *et al.*, 2003) y se encuentran expuestas en la ME.

B. canis posee en común con las otras de especies de *Brucella*, numerosos antígenos somáticos, los cuales pueden demostrarse fácilmente mediante estudios de inmunodifusión en gel, con antígenos solubles extraídos mediante la ruptura de las células con ultrasonido o con otros métodos; sin embargo, la naturaleza mucoide (rugosa) confiere a la pared celular de esta bacteria propiedades antigénicas diferentes de las de las cepas lisas de otras brucelas, por lo cual las técnicas altamente estandarizadas que se utilizan para el diagnóstico de brucelosis en otras especies no pueden usarse en el diagnóstico de infecciones causadas por *B. canis* (Díaz *et al.*, 1968). Se han demostrado reacciones cruzadas de aglutinación y precipitación entre *B. canis* y otras brucelas en fase rugosa como *B. ovis* y *B. abortus* cepa 45/20; de igual manera se producen reacciones cruzadas entre *B. canis* y algunas otras bacterias gram negativas en fase rugosa, como *Bordetella bronchiseptica*; *Actinobacillus equuli* (Carmichael y Bruner, 1968; Myers *et al.*, 1974) y con *Pseudomonas aeruginosa* (Flores, 1978). El hecho que los antígenos rugosos (R) puedan ocasionar reacciones inespecíficas con antígenos presentes en otros microorganismos, generalmente también presentes en forma rugosa, acarrea ciertas dificultades en el diagnóstico (Morgan y Corbel, 1975).

La similitud antigénica existente entre *B. canis* y *B. ovis* propició el desarrollo de la prueba rápida de aglutinación en placa, para el diagnóstico de *B. canis* empleando un antígeno elaborado con una cepa de *B. ovis* y teñido con rosa de Bengala. *B. ovis* se ha usado también con el propósito de extraer antígenos solubles con el fin de usarlos en pruebas de inmunodifusión (Myers *et al.*, 1974).

Si bien existe una marcada predilección de *Brucella sp.* por el huésped natural, pueden producirse infecciones cruzadas con otras especies de animales domésticos o silvestres y adaptaciones al medio (Lucero, 1996). Las brucelas rugosas estables (*B. canis* y *B. ovis*) presentan alto grado de especificidad de hospedador (Crespo León, 1994; López, 2007).

2.6 Genética

El ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Brucella* contiene un 58-59% de guanina + citosina y el tamaño total del genoma se ha estimado en $3,2 \times 10^6$ pares de bases (Moriyón *et al.*, 2001). Se ha confirmado la presencia de 2 cromosomas circulares, uno de los cuales tiene el doble del tamaño que el otro (Lucero, 2004).

El análisis del ácido nucleico ribosomal (16S ARNr), la composición lipídica y aspectos de su fisiología y biología, ubican al género *Brucella* dentro de la subdivisión α -2 de la Clase *Proteobacteria*, en la que están también otros patógenos intracelulares animales (*Rickettsias*),

<i>Especie</i>	<i>1º Descrip.</i>	<i>Morfología de las colonias</i>	<i>Biovar</i>	<i>Patogen. hombre</i>	<i>H. natural</i>
----------------	--------------------	-----------------------------------	---------------	------------------------	-------------------

así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*). La asociación intracelular con eucariotas es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de esta subdivisión α -2 (Moreno *et al.*, 1990; Moriyón *et al.*, 2001).

Si bien los estudios de hibridación ADN- ADN determinaron que todos los miembros del género presentan más del 95% de homología, y se lo considera un género monoespecífico (Verger *et al.*, 1975), la última clasificación en 7 especies, basada en la preferencia de huésped, características fenotípicas, antigénicas y bioquímicas, sigue siendo utilizada (Osterman y Moriyon, 2006). (Ver cuadro 3)

Sin embargo, hay estudios que indican que la estructura y organización genómica de una especie o aún de cada biovar dentro de una especie, tiene características únicas y distintivas, lo que sugiere que el género consiste en linajes clonales, cada uno adaptado en forma específica, aunque no exclusiva, a un huésped mamífero (Michaux-Charachon *et al.*, 1997; Jumas-Bilak *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que la expresión genética de *Brucella* varía según ciertas condiciones como el ambiente hostil de los fagocitos, y también que es diferente en los medios de cultivo normales y en los macrófagos. Esto supone la existencia de sistemas sensores-reguladores, de los cuales se han descrito dos, que dependen de estímulos ambientales. Uno de ellos regula genes esenciales para la virulencia, modula las propiedades de la membrana externa y se relaciona con la habilidad de penetrar en células fagocíticas (Moriyón *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Clasificación especies del género *Brucella*

<i>B. melitensis</i>	1887	lisa	1	Alta	Cabras y ovinos
			2	Alta	
			3	alta	
<i>B. abortus</i>	1897	lisa	1	Moderada	Bovinos
			2	Moderada	
			3	Moderada	
			4	Moderada	
			5	Moderada	
			6	Moderada	
<i>B. suis</i>	1914	lisa	9	Moderada	Cerdos Cerdos y liebres Cerdos Renos Cerdos
			1	Alta	
			2	Sin notificación	
			3	Alta	
			4	Moderada	
5	Alta				
<i>B. ovis</i>	1953	rugosa	-	Sin notificación	Ovinos
<i>B. neotomae</i>	1957	lisa	-	Sin notific.	Roedor
<i>B. canis</i>	1968	rugosa	-	Baja	Caninos
<i>B. maris</i>			1	Baja	Foca
			2	Baja	Cetáceo

Fuentes: López 2007; The Center for Food Security & Public Health. 2007b.

2.7 Sensibilidad a los desinfectantes

Brucella sp. es sensible a los desinfectantes disponibles más comunes incluyendo, soluciones de hipoclorito, etanol al 70%, isopropanol, yodóforos, desinfectantes fenólicos, formaldehído, glutaraldehído y xileno; sin embargo, la materia orgánica y las bajas temperaturas disminuyen la eficacia de los desinfectantes. Los desinfectantes reportados para destruir brucelas en superficies contaminadas incluyen hipoclorito de sodio al 2.5%, 2-3% soda caústica, suspensión de hidróxido de calcio, o solución formaldehído al 2% (todos examinados en 1 hora). Los compuestos de amonio cuaternario alcalino no son recomendados. El autoclavado (temperatura mayor a 121°C por lo menos 15 minutos) puede usarse para destruir *Brucella sp.* en material contaminados.

Estos organismos pueden también ser inactivados mediante calor seco (160-170°C durante por lo menos 1 hora). Dejar hervir los líquidos por lo menos 10 minutos es usualmente efectivo (The Center For Food Security & Public Health, 2007b).

3. Epidemiología

Por naturaleza, el perro es el huésped definitivo de la brucelosis canina; sin embargo, los zorros como los humanos tienen posibilidad de adquirir la infección.

La forma posible de transmisión canino-humana, incluye exposición a tejidos infectados, tal como: descargas vaginales contaminadas o secreción láctea de perras infectadas, y en menor grado es por la orina, saliva, transmisión por vectores como garrapatas y pulgas. Se realizaron estudios epidemiológicos y se encontró que existe riesgo de infección de personas expuestas con perros infectados por *B. canis*. La incidencia de brucelosis canina parece ser más alta en perros vagabundos que perros con dueño, donde la enfermedad prevalece en criaderos con grandes ventas de perros. Una vez que *B. canis* se instala en el criadero, esta bacteria se disemina rápidamente entre animales de cría. La incidencia dentro de un criadero depende del tipo de instalaciones que se tenga, manejo de los animales, así como las medidas higiénicas que se practican (Carmichael, 1978).

3.1 Distribución mundial

La brucelosis canina es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial, siendo descrita por primera vez por Carmichael y Bruner en 1966 en EE.UU, a partir de un brote de abortos y fracasos reproductivos en perros Beagle; desde entonces, la bacteria ha sido reportada en América: EE.UU, México, Argentina, Brasil, Canadá y Perú, en Asia: Japón; en África. Madagascar, India; en Europa: España, Alemania, Italia, Rumania y Checoslovaquia (Carmichael, 1990; Berthelot y Garin, 1993; Carmichael y Shin, 1996).

Sin embargo, existen excepciones en algunos países como los son Australia y Nueva Zelanda donde aún no ha sido aislada *B. canis*, lo que indica que la brucelosis canina en estos países está clasificada como enfermedad exótica. Esto se ha logrado a partir de un estricto control donde la importación de perros es controlada para prevenir la infección de *B. canis* y otras enfermedades exóticas en estos países. Sólo se permite la entrada de perros de varios países específicos dentro de condiciones rígidas de cuarentena, la cual es un requisito de importación para así tener perros libres de infección a *B. canis* y asegurar la ausencia de la misma (The Center for Food Security & Public Health, 2007c).

3.2 Transmisión

Al igual que los otros géneros de *Brucella* en otras especies animales, la infección de *B. canis* es a través de la mucosa oronasal, vaginal y conjuntival. El portador de la infección se comporta aparentemente normal, y no existe diferencia a susceptibilidad por sexo ya que tanto machos como hembras son susceptibles por igual (Carmichel, 1976; Carmichael y Joubert, 1988).

La transmisión sexual durante el apareamiento es la más frecuente entre los caninos. El mayor riesgo de contaminación no sexual se da al momento del aborto donde las secreciones entran en contacto con las mucosas del animal sano o después de la ingestión de materiales placentarios contaminados ó de fetos abortados, descargas vaginales de perras infectadas que están en celo ó que abortan y durante el apareamiento (Johnson y Walker, 1992; Carmichael y Shin, 1996).

Entre las diversas formas de transmisión de la brucella canis tenemos:

3.2.1 Transmisión directa

En esta forma de transmisión, en orden de importancia se tienen:

Vía oral: Es la más importante, ya que se relaciona con la ingestión de productos contaminados, como son las placentas y los fetos abortados (Moore y Gupta, 1968; Carmichael y Kenney, 1970; Hill *et al.*, 1970). Se estima que la dosis infectiva mínima puede estar cercana a 2.000.000 bacterias (2×10^6 ufc/mL) (Carmichael y Joubert, 1988; Johnson y Walker, 1992).

Secreciones vaginales: De hembras infectadas, seguidas de un aborto, en donde se pueden eliminar gran cantidad de organismos (10^{10} bacterias/mL), pudiendo entonces transmitirse durante el estro y en la monta. Esta secreción con alto número de organismos de *B. canis*, continúa de 1 a 6 semanas después del aborto (el cual puede pasar desapercibido), siendo una fuente significativa de diseminación, así los perros susceptibles que entran en contacto con este material pueden llegar a infectarse y desarrollar bacteremia (pasadas 2 a 3 semanas). Esta bacteremia ocurre antes de que se encuentren anticuerpos en sangre (Carmichael y Joubert, 1988, Johnson y Walker, 1992).

Vía conjuntival: Donde la dosis infectiva mínima es de 10.000 - 100.000 bacterias (10^4 - 10^5 ufc/mL) (Carmichael y Joubert, 1988; Johnson y Walker, 1992).

Vía cutánea: Por lesiones en la piel (Johnson y Walker, 1992).

Transmisión venérea: Es frecuente cuando los machos infectados alojan las brucelas en la glándula prostática y epidídimo, para así eliminar intermitentemente *B. canis*, donde la bacteria se puede eliminar vía seminal en forma intermitente por hasta 2 años postinfección ([George et al., 1979](#); [Carmichael y Joubert, 1988](#)). En los machos que presentan lesiones testiculares, el semen y el líquido prostático actúan como contaminantes a partir de la 3a a 11a semanas después de iniciada la infección (Johnson y Walker, 1992). Sin embargo, es difícil aislar la bacteria a partir del eyaculado seminal, posiblemente se pudiera lograr durante el primer o segundo mes después de la infección; de cualquier modo, el número de organismos generalmente disminuye rápidamente después de un tiempo y la eliminación de organismos en semen llega a ser esporádica; la glándula prostática parece ser el principal sitio de localización de *B. canis*, lo que hace difícil ofrecer un tratamiento para eliminar dicha bacteria ya que muchos de los antibióticos no llegan a la próstata. No se sabe a ciencia cierta la dosis infectiva mínima para infectar a una perra por esta vía, pero se considera que requiere menos que por la vía oral. Un aspecto importante es que los animales portadores pueden ser clínicamente normales (Carmichael y Joubert, 1988; Johnson y Walker, 1992).

Contacto con animales infectados: Por la unión de perros susceptibles con hembras o machos infectados. (Carmichael y Joubert, 1988). Perras adultas se han infectado luego de 4 a 5 meses después de cohabitar con hembras adultas infectadas (Johnson y Walker, 1992).

3.2.2 *Transmisión indirecta*

Lactogénica: Las secreciones mamarias durante la lactancia contienen grandes cantidades de *B. canis*, siendo posible que la leche sirva como fuente de diseminación pero tiene menor importancia, ya que los cachorros lactantes generalmente no sobreviven (Carmichael y Joubert, 1988).

Vía urinaria: La eliminación de bacterias por la orina (bacteriuria) se inicia poco después de la bacteremia (bacterias en sangre), persistiendo por al menos 18 meses en concentraciones que varían entre 1.000 y 1.000.000 bacterias/mL, por posible contaminación con líquido prostático. Existe transmisión si cohabitan cachorros susceptibles con machos infectados, a diferencia de la orina de las hembras donde la concentración de microorganismos es menor (Johnson y Walker, 1992; Carmichael y Shin, 1996; Borie y Sánchez, 2002).

Transfusión sanguínea: De un animal infectado a un animal susceptible (Carmichael, 1976).

Vectores: El aislamiento de *B. canis* a partir de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) de una perra infectada, sugiere la posibilidad de que este parásito se comporte como un vector, aparentemente sólo de tipo mecánico. La presencia de *R. sanguineus*, debe ser considerada como un importante factor epidemiológico frente a cualquier norma de control que se establezca (Borie y Pinochet, 1987).

Material médico contaminado: es posible la transmisión por medio de agujas contaminadas empleadas para recolectar sangre de perros infectados con *B. canis*, así como el uso de vaginoscopio y material para realizar inseminación artificial (Carmichael, 1976).

Transmisión vertical: Donde la transmisión de la brucelosis a las crías es debida a la colonización de las bacterias en el útero materno, en la cual, la hembra lleva a término la gestación y los cachorros nacen vivos y débiles, presentando bacteremia a la semana de edad o bien, mueren durante los primeros 7 días de edad (Carmichael, 1968). También se ha descrito que la transmisión también puede ocurrir en el ambiente uterino por ingestión de líquido amniótico (Borie y Sánchez, 2002).

3.2.3 *Vías de eliminación*

El organismo puede ser eliminado a través de las secreciones del cuerpo como es la orina, semen, descargas uterinas, tejidos fetales, secreción láctea, saliva y heces (Wright y Bruce, 1989).

3.3 *Especies susceptibles*

3.3.1 *Infección natural*

Por naturaleza se ha reconocido la enfermedad en perros y rara vez en el hombre, demostrándose que todas las razas caninas son susceptibles a la enfermedad. En un principio se pensó que los beagles eran la única raza susceptible, pero actualmente se sabe que otras razas, así como cruces de razas, pueden sufrir la infección natural (Henderson *et al.*, 1974; Flores y Segura, 1975). El Dr. Pickerill (1970), consideró la posibilidad de que *B. canis* es una amenaza potencial en animales domésticos y salvajes.

3.3.2 Infección experimental

Se infectaron experimentalmente con *B. canis* a conejos, gatos, ratones, ratas y cuyes. Los conejos desarrollaron orquitis y abscesos peritoneales después de la inoculación por vía oral, conjuntival e intraperitoneal (Carmichael, 1978). Los bovinos y porcinos son sumamente resistentes a la inoculación por vía oral y conjuntival; sin embargo, las ovejas preñadas y no preñadas, expuestas por vía conjuntival, desarrollaron una leve infección, asintomática y de bacteremia e inducen formación de anticuerpos en bajas concentraciones (Pickerill, 1970). Los gatos fueron algo susceptibles, presentaron títulos de aglutinación por la vía oral, desarrollando solo un grado mínimo de bacteremia y anticuerpos, la mayoría de los gatos presentó títulos de 1:50 (Carmichael, 1978).

3.3.3 Animales silvestres susceptibles

La enfermedad ha sido poco estudiada en animales silvestres. Los zorros rojos (*Vulpes fulva*), se inocularon oralmente desarrollando bacteremia a partir de la 4ta a la 5ta semana pos inoculación; quedaron bacterémicos, presentaron títulos de aglutinación positivos hasta la necropsia, esto fue después de 14 semanas de la inoculación. Las lesiones que presentaron fueron similares a la de los perros; lo que indica que el zorro es altamente susceptible a la brucelosis canina (Pickerill, 1970; Baker, 1971).

La transmisión experimental de *B. canis* en primates no humanos (*Macaca aractoides* y *Macaca mulatta*) ha sido ampliamente descrita (Percy *et al.*, 1972). Desarrollaron lesiones de hepatitis, focos granulomatosos, esplenitis y linfadenitis. En *M. aractoides* se produjo bacteremia durante 5 semanas y la bacteria no se pudo aislar 7 semanas después de la inoculación. En contraste con los perros, la inoculación por vía oral y conjuntival en monos no produjo lesiones en el tracto reproductivo (Carmichael, 1978).

Estudios serológicos realizados en carnívoros silvestres revelaron que la prevalencia en estos animales es baja. En 766 sueros de éstos, se encontraron resultados negativos: entre los animales estudiados se incluyeron zorrillos, zorros grises, zarigüeyas y lobos; en contraste, se obtuvieron títulos significativos de anticuerpos en sueros de gato montés, zorro rojo y coyote (títulos 1:200). En resumen, los estudios realizados mostraron que los perros son más susceptibles, el zorro salvaje y los gatos presentan una susceptibilidad inferior a los perros, mientras que los ovinos, cerdos y bovinos son más resistentes a *B. canis* (Hoff *et al.*, 1974).

3.4 Incidencia y Prevalencia

La incidencia de *B. canis* ha sido reportada en varios países de Europa, Asia, Africa y America, la confirmación se lleva a cabo por aislamiento del agente etiológico o análisis serológico basado en la prueba de aglutinación con 2 mercaptoetanol, prueba de precipitación en gel, prueba de aglutinación rápida, ELISA, etc. (Carmichael, 1976; Shin y Carmichael, 1999).

En EEUU, la incidencia parece relativamente baja entre perros vagabundos y perros con dueño; una incidencia media parece estar en 1 a 1.5% aproximadamente; de cualquier manera, se ha reportado prevalencias de un 5 a 6% a *B. canis* en algunos estados del sur.

En 1980, se analizaron 131 sueros caninos de perros vagos en Moreno, Argentina, los cuales presentaron un 30.5% (40 perros) de aglutinación de anticuerpos de *B. canis*, con títulos de 1:200 a 1:3200. En 81 perros, se realizó un cultivo aislándose *B. canis* de la sangre de 5 perros, siendo positivos a la prueba de 2-mercaptoetanol y aglutinación en tubo (Myers y Varela-Díaz, 1980).

Posteriormente, se estudiaron 64 muestras serológicas de sangre canina para detectar anticuerpos contra *B. canis*. Los sueros se sometieron a la prueba de inmunodifusión agar gel, utilizando antígeno soluble de *B. ovis*, encontrándose que el 15.62% (10 perros) eran positivos. Luego, se procesaron los sueros caninos por la técnica de aglutinación lenta en tubo y 2 mercaptoetanol, empleando antígenos de *B. abortus* 1119/3 obteniendo 4 reacciones, 2 presentaron títulos de 1:50 y 2 con títulos de 1:100, de estos, 3 fueron positivos a la prueba con 2 mercaptoetanol; 1 con dilución de 1:25 y 2 con 1:50. Estos hallazgos sugieren la presencia de un foco endémico de *B. canis* en la población de perros vagabundos de Argentina (Myers y Varela-Díaz, 1980; Miranda *et al.*, 1986) (Figura 1).

En el Perú se tienen antecedentes de estudios, realizado en 1977 en el área de Lima Metropolitana, donde se encontró que de un total de 196 muestras, 54 salieron positivas a la prueba de aglutinación en tubo 2-mercaptoetanol (28%). En el 2005 se realizó un estudio similar, donde se tomaron 456 muestras de sangre de perros residentes en los distritos de Bellavista y Callao (Lima), resultando 71 muestras positivas utilizando la prueba de inmunodifusión en gel agar (15.57%) (Reyes, 1977; Ramírez, 2005).

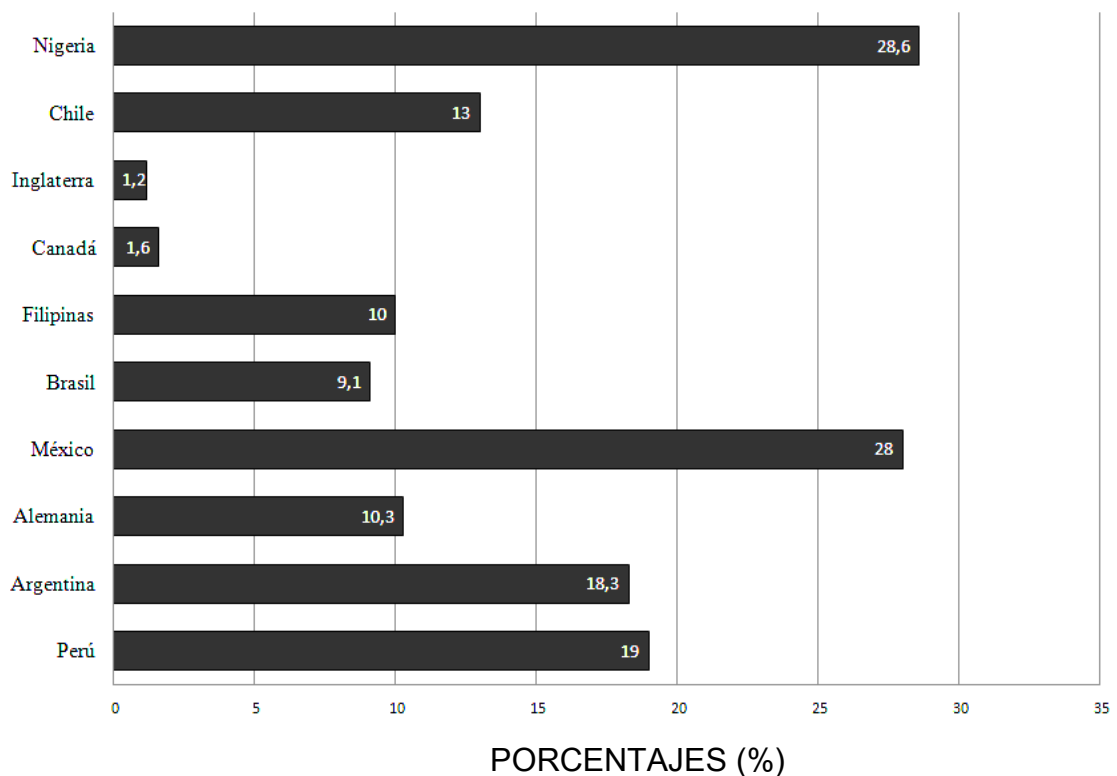


Figura 1. Prevalencia y distribución de *B. canis* en diferentes países

Fuente: Borie y Pinochet, 1987

4. Patogenia

La patogénesis de la infección por *B. canis* en perros es similar a la brucelosis de otras especies. Las especies de *Brucella* replican tanto en las células con función fagocítica como en células no fagocíticas; son patógenas intracelulares facultativas (Gorvel y Moreno, 2002), propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos y de los mecanismos efectores dependientes de anticuerpos; esto justifica la naturaleza crónica de la infección, ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas (Castro *et al.*, 2005).

La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes y a la producción de guanosina 5'-monofosfato (GMP) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la degranulación, la activación del sistema haluro-mieloperoxidasa y la producción del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) (Teixeira-Gomes *et al.*, 2000).

Se ha observado que las cepas rugosas, resultan más susceptibles a la muerte intracelular. Así, entre 7-10 horas después de la invasión, el recuento de bacterias intracelulares de fenotipo liso cae en un 90% y en un 99% para las bacterias de fenotipo rugoso (Comerci *et al.*, 2001; Boschiroli *et al.*, 2002).

La bacteria probablemente ingresa en el perro, gracias a su capacidad de inhibir la formación del complejo fagolisosoma y, por tanto, impidiendo así la acción lítica de enzimas lisosomales (Flores y Carmichael, 1981). En la endocitosis realizada por neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos, se produce la activación de la degranulación, activación de otras células del sistema inmune a través de la liberación de citoquinas y activación del estallido respiratorio. *B. canis* resistiría la acción del peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos formados durante la explosión respiratoria a través de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa que eliminan completamente estos radicales (Corbel, 1997). Posteriormente, aproximadamente 1 semana después de la infección, por vía linfática, la bacteria invade los ganglios regionales: retrofaríngeos si la ruta de entrada fue oral o conjuntival; inguinales e iliacos si fue genital., los que se ven aumentados de volumen a expensas de una hiperplasia linfoide y de macrófagos (Wright y Bruce, 1989). En cachorros que fueron experimentalmente infectados al nacer, se produjo inflamación en los ganglios linfáticos, y la bacteremia persistió por lo menos durante 36 meses. En estos animales hubo retraso en el crecimiento y la mayoría de las hembras mostraron retardo en la madurez sexual. Las lesiones en epidídimo y testículo de los machos (infectados al nacer), se hicieron aparentes entre los 8 y 10 meses de edad (Flores, 1978).

Si *B. canis* logra vencer la barrera inmunitaria, se propaga vía linfática o hematógena, provocando una bacteremia 1 a 4 semanas posterior a la infección, la que puede persistir por largos períodos (6 a 64 meses) y por consiguiente presenta una producción eventual de anticuerpos específicos frente a *B. canis* (Johnson y Walker, 1992; Root-Kustritz, 1999). El daño que produce es la destrucción celular de los tejidos del cuerpo del hospedador. La bacteria es capaz de colonizar órganos tales como hígado y bazo, y con la participación del sistema monocito-macrófago induce, nuevamente, hiperplasia linforeticular. La bacteria se replica dentro de los linfocitos y células linforeticulares por un período de tiempo indefinido produciendo hiperplasia y formación de granulomas en órganos como ganglios linfáticos, médula ósea bazo, hígado; en hembras maduras en útero y glándula mamaria; en los machos sexualmente maduros en los testículos, vesículas seminales próstata, epidídimo, donde en estos dos últimos produce una fuerte infiltración de células inflamatorias. Posteriormente, los

organismos son eliminados a través de la orina, semen, descargas vaginales, fetos abortados, leche y posiblemente en heces y saliva ([Carmichael y Greene, 1993](#); Mota, 1998).

El útero, al parecer, no es un sitio ideal para el crecimiento de la bacteria en hembras no preñadas, aunque en las gestantes, el útero es un sitio ideal de infección, infectando así al feto por la vía placentaria (Carmichael y Kenney, 1970).

En una hembra preñada, los organismos probablemente invaden el feto por la vía placentaria, donde las altas concentraciones de organismos en el líquido amniótico, así como la presencia de leucocitos en el lumen estomacal y tracto intestinal de cachorros abortados son sugestivos que la infección del feto puede ocurrir por la ingestión del líquido amniótico (Carmichael y Kenney, 1970). También se tienen otras teorías como que en las hembras gestantes las bacterias se alojan en la placenta, disminuyendo el aporte de oxígeno al feto, teniendo como consecuencia la reabsorción embrionaria si la muerte ocurre en el primer tercio de la gestación y si la bacteria invade el epitelio trofoblástico que envuelve al embrión a los 45 días de preñez produce una placentitis que finalmente conduce al aborto (Borie y Sánchez, 2002).

El análisis de la patogenia en el aparato reproductor de los perros infectados señala que se trata de una respuesta autoinmune a la colonización de *B. canis* en el tracto genital (Serikawa *et al.*, 1984; [Johnson y Walker, 1992](#)). La figura 2 muestra la patogénesis de la brucelosis canina en los perros infectados.

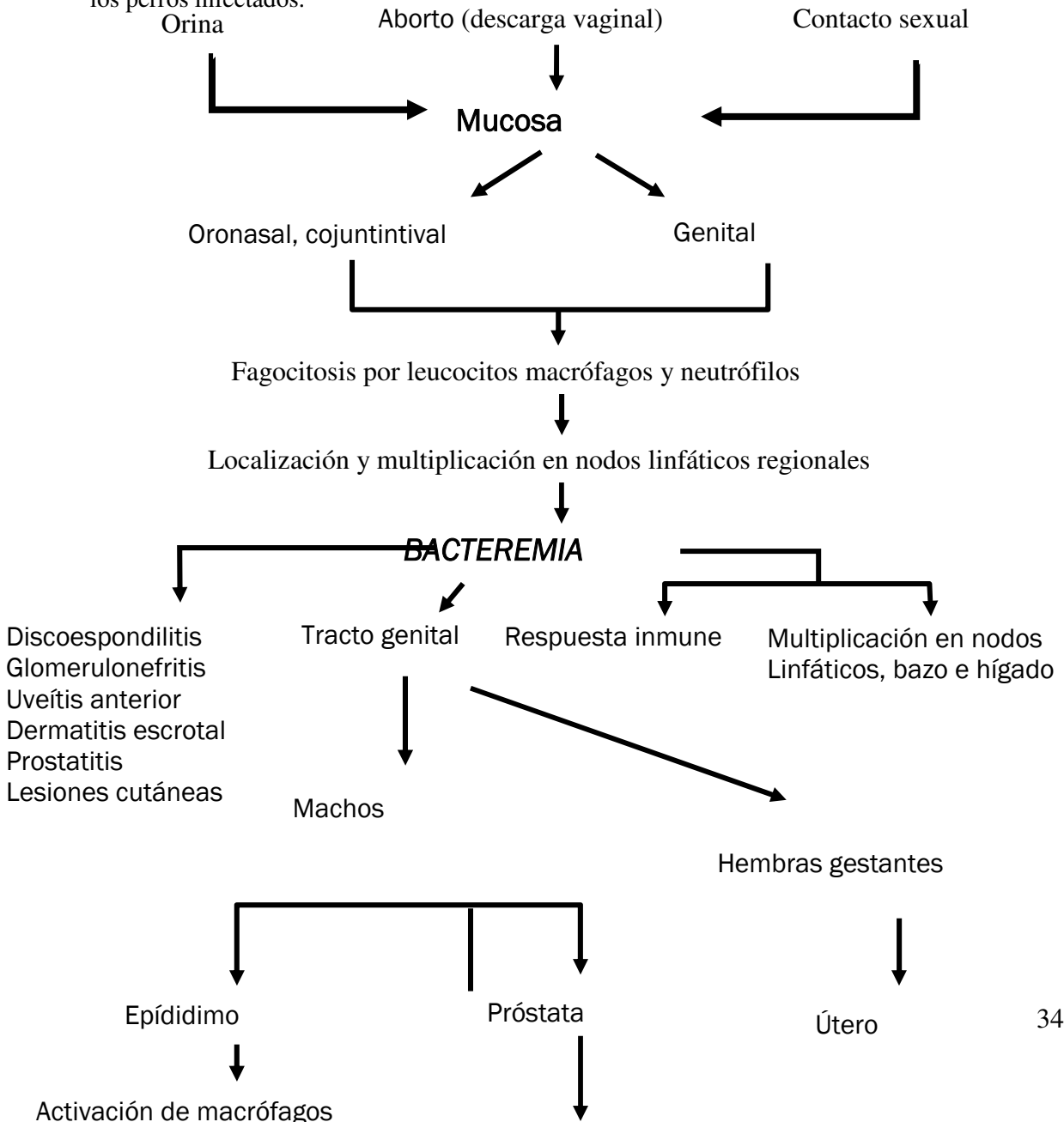


Fig. 2. Patogénesis de la brucelosis canina

Fuente: Grenne, 1990; Peña y Butrón, 1991; Sharon et al., 1992

5. Signología

5.1 Período de Incubación

El período de incubación es variable, y depende de la ruta de infección, es decir, si el animal se infecta a través de la vía oral, presenta bacteremia pasadas 2 o 3 semanas. A diferencia de la infección por la vía venérea, donde la bacteremia está presente a partir de la primera semana; si existe infección por contacto de un animal susceptible con un animal infectado la bacteremia se manifiesta después de la primera a la tercera semana pos exposición. Si la infección es inducida vía intravenosa, la bacteremia aparece al cuarto día (Carmichael, 1978).

5.2 Signos clínicos

Las características clínicas y patológicas de la enfermedad han sido ampliamente descritas (Carmichael, 1967; Shin y Carmichael, 1999; Borie *et al.*, 2002) (Cuadro 5). La brucelosis canina es una enfermedad de tipo infecciosa, con manifestaciones clínicas variables, frecuentemente la presencia de aborto es el único signo de enfermedad. En ocasiones se aprecia el agrandamiento generalizado de los nódulos linfáticos; así como la ausencia total de fiebre, no hay signos de incomodidad y no hay dolor por lo que puede pasar desapercibida por mucho tiempo en perros que no son utilizados para la reproducción. (Carmichael y Joubert, 1988). Se ha considerado que la falta de fiebre se debe a la poca cantidad o insuficiencia de endotoxina lipopolisacárida de *B. canis* (Ramírez, 1978).

5.2.1 Hembras

Brucella canis no afecta el ciclo estrual, presentan la infección sólo después del primer celo. (Carmichael y Joubert, 1988; Wright y Bruce, 1989)

El primer signo de infección en las hembras gestantes es el aborto súbito entre la séptima a novena semana, en promedio en el día 53 de preñez con un rango de 45-59 días de gestación en aproximadamente el 75% de los casos, con una descarga vaginal ligera a moderada pocos días antes su presentación y que se prolonga hasta 6 semanas después del aborto (Carmichael, 1996; Borie y Sánchez, 2002). Las perras infectadas generalmente llegan a abortar sólo una vez y

algunas hasta 2 veces, aunque se han registrado casos de 4 abortos consecutivos en una misma hembra (Pickerill, 1970). El aborto se presenta en cualquier fase de la preñez y puede manifestarse como muerte temprana embrionaria o fetal, esto ocurre entre los primeros 20 días de gestación, por lo cual no es detectado y es por ello que se le atribuye que la perra es estéril, o bien, que existen fracasos para concebir en el próximo estro seguido de un aborto. No se ha observado retención placentaria (Moore, 1969). Algunas veces, la hembra lleva a término la gestación y los cachorros nacen vivos y otros muertos, los que sobreviven se encuentran débiles y no sobreviven por más de 1 a 3 días, existiendo así muertes neonatales, disminuyendo el número de crías por parto. (Johnson y Walker, 1992; Martín *et al.*, 1992) (Cuadro 4).

Con frecuencia los cachorros que nacen vivos presentan linfadenopatía periférica generalizada como cuadro clínico de enfermedad hasta que alcancen la madurez sexual, presentan hiperglobulinemia, leucocitosis y a menudo están bacterémicos. No se sabe si estos, se recuperan antes de presentar la madurez sexual, como a menudo se ve en animales afectados con otras especies de *Brucella* (Rusell *et al.*, 1982).

Una descarga vaginal de consistencia mucoide, serosanguinolenta, de coloración verde-grisácea, es un signo clínico de una perra que ha abortado; esta secreción se prolonga hasta por 4 a 6 semanas. Otros signos peculiares son la metritis y placentitis (Luna, 1991; Corro, 1994; Borie y Sánchez, 2002).

Las hembras infectada que no están gestando no tienen manifestaciones clínicas, pero eliminan la bacteria a través de la orina o secreciones vaginales por varios intervalos (Johnson y Walker, 1992).

Cuadro 4. Efectos de la brucelosis canina sobre índices reproductivos

<i>Característica</i>	<i>Año normal</i>	<i>Año post-infección</i>
Total de cruzas	58.0	59.0
Abortos	1.0	19.0
Falla en la concepción	4.0	15.0
Reabsorciones	0.0	8.0
Cruzas exitosas (%)	91.40% (53/58)	28.80% (17/59)
Cachorros nacidos	282.0	74.0
Cachorros/hembra/año	5.7	1.5

Fuente: Pollock, 1979

5.2.2 Machos

En los machos, destaca la infertilidad como una entidad progresiva e irreversible (Johnston *et al.*, 2001). Estos se ven afectados a partir de la pubertad; en los machos, el principal signo es la epididimitis de uno o ambos testículos e infertilidad (Carmichael y Shin, 1996). Además de epididimitis y orquitis, es común la presencia de prostatitis en diferentes grados de severidad (Borie *et al.*, 2002). Aunque no es un rasgo prominente, también se pueden presentar orquitis no purulentas, uni o bilateral, dermatitis o edema escrotal, oligospermia, y en estados más crónicos, estos procesos inflamatorios terminan con atrofia testicular uni o bilateral, y prostatitis (Johnson y Walker, 1992; Johnston *et al.*, 2001).

Rutinariamente no se detecta la inflamación del epidídimo, porque los perros afectados no presentan manifestaciones clínicas aparentes, no hay fiebre y no hay signos de incomodidad, a menos que el volumen del escroto sea muy aparente. A la palpación los perros no presentan dolor. De aquí que el signo clínico reconocido de brucelosis canina en los machos es la infertilidad por la inflamación y la interferencia en la espermatogénesis, así como una calidad espermática anormal; esto debido a la presencia de anticuerpos auto-inmunes (anti-espermatozoides) que se producen cuando los antígenos espermáticos llegan al torrente sanguíneo después de ser ingeridos por macrófagos (Carmichael, 1976). Es por ello que un macho, difícilmente puede preñar a una hembra (Johnson y Walker, 1992; Carmichael, 1996). Los machos infectados crónicamente pueden no tener espermatozoides, ó tener un número reducido de espermatozoides inmaduros (Shin y Carmichael, 1999).

La atrofia testicular contiene células de Sertoli, no se realiza la espermatogénesis. En la próstata, el daño provocado por *B. canis* se explica por el gran número de microorganismos presentes, los cuales persisten por más de seis meses; así como la eliminación por orina en machos infectados más que en la orina de las hembras (Johnson y Walker, 1992).

5.2.3 Signos no específicos

Los signos no específicos en ambos sexos incluyen letargia, malestar, condición corporal pobre, anomalías en la conducta, pérdida de vigilancia (perros guardianes), fracasos para realizar diferentes tareas en perros adiestrados, pérdida del libido, manifestaciones dérmicas como úlceras cutáneas, Petequias y en casos crónicos puede haber pérdida de apetito y por consiguiente pérdida de peso, envejecimiento prematuro y agrandamiento ganglionar generalizado (Carmichael, 1978; Shin y Carmichael, 1999). Por lo general, no hay alteración en el cuadro hemático ni en valores bioquímicos o del uroanálisis. Ocasionalmente puede detectarse una hiperglobulinemia. (Johnson y Walker, 1992).

5.2.4 Otros signos

Se dan de acuerdo con el sitio de colonización de la bacteria, pudiéndose presentar lesiones como:

5.2.4.1 Discoespondilitis

Hay mayores evidencias de que la espondilitis puede estar asociada con la infección de *B. canis*, puesto que la lesión se ha observado en casos en que el diagnóstico serológico confirmó la enfermedad (Henderson *et al.*, 1974). En varios casos de animales con historia clínica de espondilitis, se ha aislado *B. canis* a partir de sangre (Flores, 1978).

Dentro del cuadro clínico destaca el dolor, el cual es provocado por la inflamación de las raíces nerviosas y de las meninges. El diagnóstico se basa en placas radiográficas de la columna

vertebral, donde puede apreciarse diferentes espacios discales afectados (Sharon *et al.*, 1992; Corro, 1994; Fenner, 1994).

5.2.4.2 Lesiones cutáneas

Son poco frecuentes, pero pueden llegar a ser diagnosticadas.

Dawkins *et al.* (1982) encontraron una lesión en el corvejón de una hembra Beagle, esta se desarrolló y extendió, caracterizándose por múltiples áreas hiperémicas difusas con exudado seropurulento, inflamación, edema y granulomas irregulares en la superficie. Un cultivo en placa durante 48 horas o 4 días son de gran utilidad para determinar si *B. canis* es o no un patógeno dermal.

Una hembra Schnnauzer gigante, presentó cojera en el miembro posterior izquierdo, así como lesiones pustulares en la piel en diferentes regiones del cuerpo (región dorsal, costal craneolateral del muslo izquierdo y región poplítea); se obtuvo el aislamiento y cultivo de *B. canis* a partir del exudado caseoso de dichas lesiones en un medio T.S.A. (Peña y Butrón, 1991).

5.2.4.3 *Dermatitis escrotal*

Los machos clínicamente se encuentran normales, presentan agrandamiento escrotal con una tonalidad rojo-castaño, así como úlceras. Esta lesión se encuentra asociada a *Staphylococcus sp.* donde invade el escroto como consecuencia del lamido (Schoeb y Morton, 1978; Kirk, 1997).

5.2.4.4 *Prostatitis*

Muchas veces asociado a infecciones por *B. canis*, puede ser aguda, crónica con formación de abscesos o subclínica. La infección de la próstata puede ocasionar infección de las vías urinarias o bien, infertilidad, presentando signos clínicos de dolor, disuria, y hemorragia uretral. En ocasiones puede presentarse prostatomegalia debido a la infiltración pleocelular de neutrófilos, linfocitos, plasmocitos e hiperplasia celular de los túbulos prostáticos y aumento del tejido intersticial (Fenner, 1994).

5.2.4.5 *Uveítis anterior*

Inflamación del iris y del cuerpo ciliar. Clínicamente se presenta como un ojo rojo, doloroso, con epífora, fotofobia, blefarospasmos, exoftalmia; también puede presentar hipema y opacidad de la córnea (Fenner, 1994).

Se han descrito en casos crónicos uveítis anterior; además, se ha logrado el aislamiento de *B. canis* a partir del ojo de animales infectados que presentan esta lesión; las aglutinaciones practicadas con el humor acuoso indicaron la presencia de niveles elevados de anticuerpos (Gwin *et al*, 1980).

Finalmente, dentro de otras manifestaciones clínicas que se pueden presentar están: meningitis, artritis, glomerulonefritis, hepato y esplenomegalia (Johnson y Walker, 1992).

Cuadro 5. Signos clínicos sobresalientes en la brucelosis canina

Hembras	Machos
Aborto espontáneo entre los días 45-59 de gestación	Prostatitis.
Muertes embrionarias tempranas (falla concepción)	Epididimitis.
Infertilidad	Dermatitis escrotal.
Disminución en el número de cachorros por parto	Edema escrotal.
Metritis	Atrofia testicular, por lo general unilateral.
Placentitis	Falta de eyaculado, azoospermia.
Secreciones vaginales de color verde grisáceo de consistencia mucoide, serosanguinolenta	Infertilidad

Fuente: Zoha y Carmichael, 1982; Johnson y Walker, 1992; Corro, 1994).

5.2.5 Curso

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa de curso crónico (Martin *et al.*, 1992). En esta etapa se presenta la atrofia testicular, esto es después de 60 semanas de infección o más; el semen contiene pocas células inflamatorias y bajo número de espermatozoides (Johnson y Walker, 1992). Así mismo, produce una prolongada bacteremia, la cual persiste por largos períodos, es decir 2 años o más (Russell *et al.*, 1982).

6. Hallazgos histopatológicos

Morfológicamente, la enfermedad causada por *B. canis*, invade los tejidos reticuloendoteliales, y vasos sanguíneos de órganos del tracto reproductivo; los linfocitos, células plasmáticas y reticulares son las células principalmente involucradas, dando como resultado reacciones hiperplásicas de células reticulares de los órganos linfoides con infiltración de linfocitos, macrófagos, y células plasmáticas así como la formación de granulomas (Johnson y Walker, 1992). Una lesión que se considera única para infecciones crónicas de *Brucella* es la presentación de meningitis y encefalitis no supurativas (Carmichael y Kenney, 1970).

Las lesiones *pos mortem*, incluyen linfadenopatía generalizada, esplenomegalia, cualquier órgano puede verse involucrado, las placas de Peyer siempre están afectadas, en el centro tienen un alto índice mitótico y de vez en cuando hay infiltración de neutrófilos. Las áreas corticales de los nodos linfáticos y la pulpa blanca del bazo presentan acumulaciones focales o difusas de células reticulares con hiperplasia de linfocitos en la unión corticomedular, haciéndose prominentes las sinusoides de la médula, existiendo agrandamiento medular en la zona central por la invasión de plasmocitos (Carmichael y Kenney, 1970).

También tenemos que se presentan lesiones focales en la corteza renal con fibrosis intestinal, engrosamiento de la membrana basal y hialinización de algunos glomérulos (Segura, 1976).

6.1 Hembras

Cuando recién han abortado, presentan hipertrofia glandular del útero con infiltración de la lámina propia por linfocitos y formación de granulomas con infiltración de neutrófilos. Una lesión importante es la presencia de restos de placenta en el útero, presentando necrosis focal coagulativa de las vellosidades coriónicas (Ramírez, 1978), así como vulvitis (Carmichael y Kenney, 1970).

6.2 Machos

Se presenta epididimitis, orquitis, dermatitis escrotal (Shin y Carmichael, 1999); y destrucción del tejido glandular, degeneración de túbulos seminíferos con espermatogonias y células de Sertoli en el lumen, en casos severos hay pérdida de los túbulos seminíferos los cuales son sustituidos por tejido de tipo fibroso (Ramírez, 1978). La epididimitis es más frecuente que la orquitis y que la orquitis asociada a epididimitis (Johnson y Walker, 1992). La inflamación de estos órganos no es supurativa, observándose, además, espermatozoides en el espacio extratubular ya sea a nivel intersticial o peritubular (Carmichael, 1998).

En testículos se ha descrito atrofia, proliferación de linfocitos, células plasmáticas y tejido reticular, además de arteritis necrotizante y vasculitis (Spink y Morisset, 1970). En suma, se produce un cambio degenerativo testicular, así como también se encontró engrosamiento de la túnica albugínea (Segura, 1976).

No se conoce bien la razón por la cual la bacteria coloniza preferentemente el tejido epididimario, pero se ha asignado importancia a la anatomía de los vasos sanguíneos y a una marcada adhesividad que poseen las brucelas rugosas a la superficie celular (Dettleux *et al.*, 1990).

La epididimitis ocurre a partir de la tercera a la quinta semana de infección; es causada por la acumulación de células inflamatorias, como son los linfocitos, neutrófilos y macrófagos que se observan en los conductos deferentes (Segura, 1976), también se caracteriza por la infiltración de células mononucleares, fagocitosis espermática por los macrófagos y multiplicación de células gigantes, así como la producción de anticuerpos y aglutinación espermática (Johnson y Walker, 1992).

Dentro de las anomalías espermáticas más frecuentes que explicarían la infertilidad característica de los machos infectados con *B. canis*, se señalan células espermáticas inmaduras, retención de gota citoplasmática proximal, presencia de colas enrolladas, desprendimiento de cabezas y aglutinación cabeza-cabeza (George *et al.*, 1979). Estas alteraciones impiden el normal desplazamiento de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación o la adecuada interacción gamética (De los Reyes, 2000).

En el análisis histológico de un perro azoospermico, se muestran alteraciones severas de la línea espermatogénica en todos los túbulos seminíferos. En la mayoría de ellos la diferenciación celular progresó sólo hasta espermatocitos primarios y en ninguno se observó espermátidas ni espermatozoides (Figuras 3 y 4). Algunos túbulos seminíferos estaban formados exclusivamente por células de Sertoli y otros en franco proceso degenerativo. En general las membranas basales se observaron alteradas (engrosadas o discontinuas). También se encontraron hemosiderófagos en los túbulos seminíferos, indicando destrucción de glóbulos rojos. Todo esto, además de la presencia de eritrocitos en el lumen (Figura 5), indica una alteración a nivel de la barrera hematotesticular o ruptura tubular (Borie *et al.*, 2002). Al respecto, Carmichael (1998), señala la salida de espermatozoides a través de los túbulos seminíferos en perros que cursan con orquitis.

La alteración de la red hematotesticular implica que determinantes antigénicos espermáticos pasen a la circulación periférica desencadenando una respuesta autoinmune en el animal (Flanders *et al.*, 2000). La salida de espermatozoides explicaría una autosensibilización con aparición de anticuerpos antiespermáticos y reacciones de hipersensibilidad tardía contra antígenos de estas células, situación que contribuye a perpetuar la orquitis-epididimitis y detener la espermatogénesis, pudiendo provocar azoospermia en casos crónicos (Johnson y Walker, 1992).

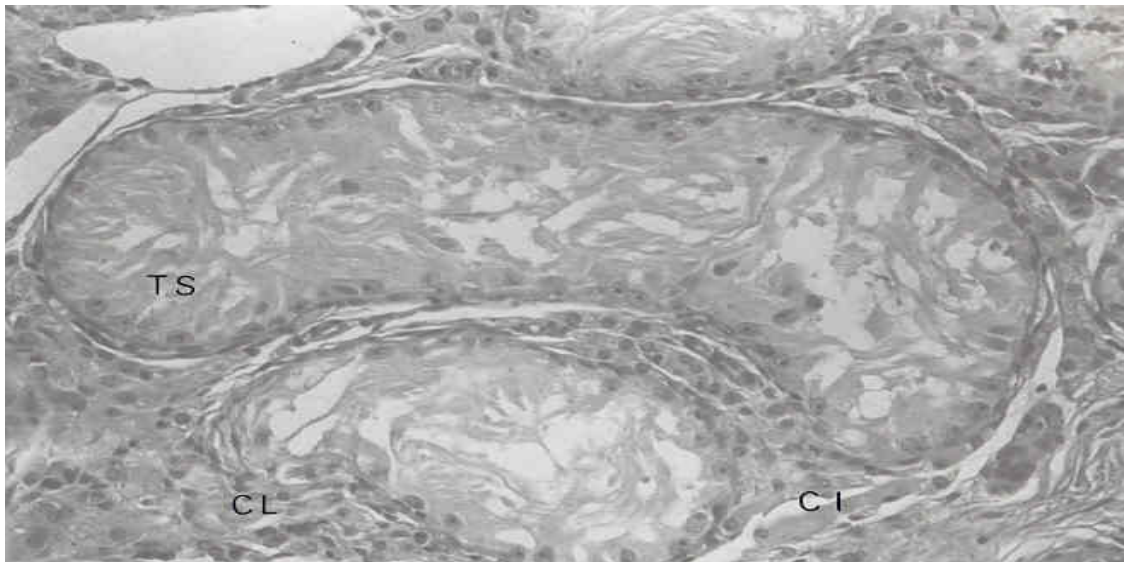


FIGURA 3. Túbulos seminíferos (TS) con predominio de células de Sertoli y ausencia de desarrollo de la línea germinativa. Compartimento intersticial (CI) con presencia de células de Leydig (CL) de apariencia normal (Tinción hematoxilina-eosina, 300X).

Fuente: Borie et al., 2002.

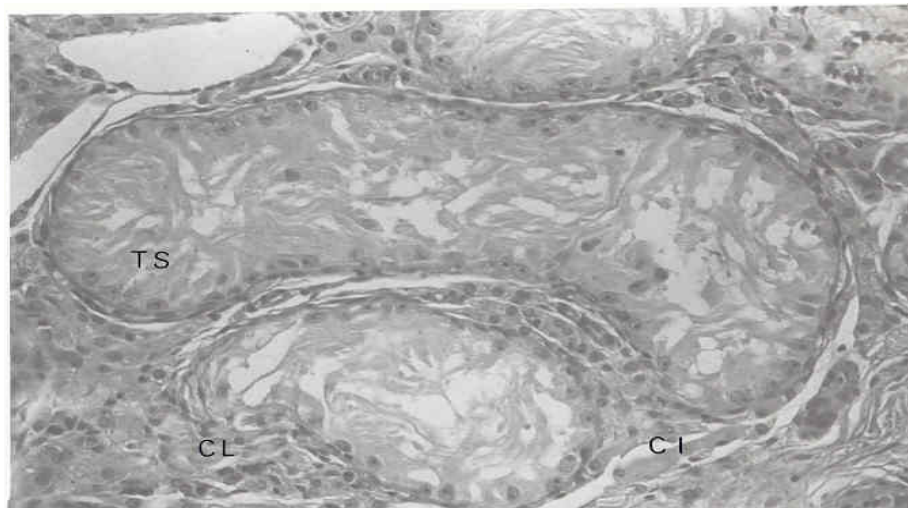


FIGURA 4. Túbulos seminíferos 1 (TS1), presencia de glóbulos rojos y blancos en el lumen y células descamativas del epitelio, vacuolización de algunos segmentos epiteliales, engrosamiento parcial del peritúbulo (Tinción hematoxilina-eosina, 300X).

Fuente: Borie et al., 2002.

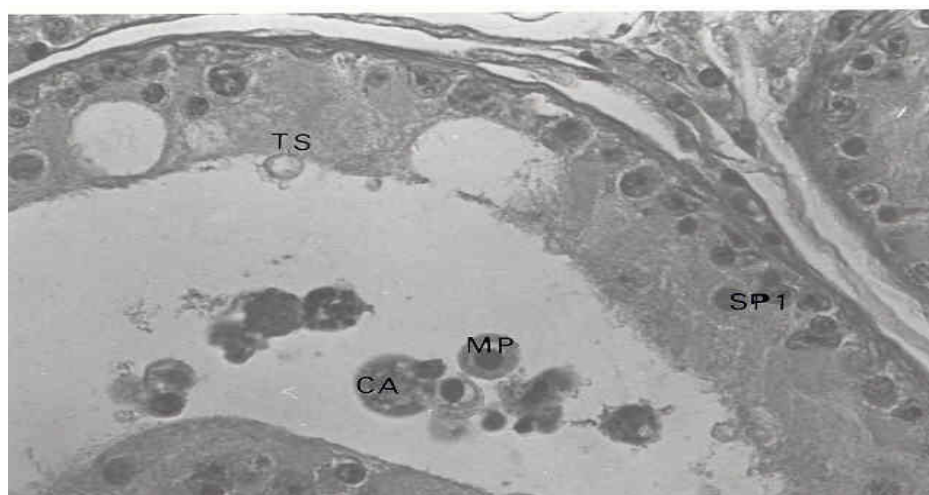


FIGURA 5. Túbulos seminíferos (TS) con abundantes células de Sertoli con citoplasma finamente granulado, desarrollo incompleto de la línea germinativa, escasos espermatoцитos I (SP1), presencia de grandes vacuolas en el epitelio. En el lumen se observan células descamadas apoptóticas (CA) y de macrófagos (MP), cargados con pigmentos tipo hemosiderina (Tinción hematoxilina-eosina, 300X).

Fuente: Borie et al., 2002.

6.3 Fetos

Presentan congestión y hemorragia en diferentes órganos, acumulación perivascular de linfocitos en hígado (Russell *et al.*, 1982). A menudo, la placenta y los fetos presentan autólisis (Johnson y Walker, 1992). Otras lesiones que se observan en fetos abortados son bronconeumonía, miocarditis, hemorragias focales en riñón con infiltración linfocitaria y células reticulares en el intersticio y tejido perivascular de la pelvis renal, linfadenitis y hepatitis (Ramírez, 1978; Briseño, 1990).

7. Diagnóstico

El diagnóstico de confirmación de la brucelosis canina no siempre es directo, los resultados de sangre completa, perfiles bioquímicos y el uroanálisis no son alterados por la presencia de *B. canis*, aun cuando esta enfermedad es sistémica y generalizada, lo único que se ha detectado es hiperglobulinemia (Johnson y Walker, 1992).

7.1 Diagnóstico clínico

Los signos clínicos no son los indicados para establecer un diagnóstico (Carmichael, 1978). Debido a esto, es necesario que se realicen otros métodos de diagnóstico (Flores y Carmichael, 1978). Aun así habría que considerar los abortos, lesiones testiculares, óseas y articulares como signos sugestivos de la enfermedad (Carmichael y Shin, 1996).

7.2 Examen de Semen (Espermatografías)

Es importante realizarlo, ya que se presentan anomalías en la calidad espermática, no hay pérdida de libido, pero si hay disminución en el volumen de eyaculado (Carmichael y Greene, 1993); dichas anomalías son características pero no específicas a infección de *B. canis*. Las anomalías, que se presentan a las 5-8 semanas pos infección, son la presencia de espermatozoides inmaduros, acrosomas deformes y retención de la gota protoplasmática. Después de 15 semanas, los espermatozoides presentan colas dobladas, cabezas separadas y aglutinación de cabeza con cabeza (causada por anticuerpos antiespermáticos) (Wright y Bruce, 1989; Carmichael y Greene, 1993), durante las semanas 60-100 después de adquirir la infección, hay pocas células inflamatorias, la motilidad es de 60-70% (el promedio de motilidad normal es de 85%) con un 50-70% de espermias anormales (los espermatozoides anormales deberían estar en menos del 20%) (Wright y Bruce, 1989); anomalías morfológicas; disminución en el

número de espermatozoides y en el volumen seminal, más del 90% de espermias son anormales, lo que indica una progresión de anomalías espermáticas, en donde los animales con curso crónico llegan a ser azoospermicos (Johnson y Walker, 1992; Shin y Carmichael 1999).

7.3 Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico de brucelosis causada por *B. canis* se realiza utilizando antígenos proteicos o preparados con R-LPS, en este último la especificidad está dada por el PS (Lucero, 2004). Aprovechando la reactividad cruzada de *B. canis* con *B. ovis*, esta última ha sido utilizada como antígeno para el diagnóstico de brucelosis canina (Alton *et al.*, 1988). Pero una cepa mutante (M-) de *B. canis* ha demostrado ser más específica (Carmichael y Joubert, 1987).

Las pruebas serológicas usualmente utilizadas en caninos son una prueba rápida de microaglutinación (RSAT) y una prueba de aglutinación en tubo (ambos con un tratamiento previo con 2-mercaptoetanol). Estas pruebas son muy sensibles pero presentan resultados falsos positivos. La IDGA ha sido utilizada pero a veces las bandas de precipitación son difíciles de interpretar. Más recientemente ha sido propuesto un ELISA que usa como antígeno un extracto salino caliente de *B. canis* (M-), que presenta alta sensibilidad y especificidad (Lucero *et al.*, 2002).

Otros métodos utilizados en el diagnóstico de brucelosis canina han sido la fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta (Wanke, 2006) y la contraelectroforesis (Borie *et al.*, 2002).

En la actualidad se han descrito varios métodos para el diagnóstico serológico de esta enfermedad (Shin y Carmichael, 1999); sin embargo, los resultados que con ellos se obtienen deben interpretarse con suma precaución.

Este tipo de diagnóstico es sólo con el propósito de determinar la presencia o ausencia de la enfermedad (Ramírez, 1978). Actualmente, no hay antígeno estandarizado ni una prueba serológica de referencia para el diagnóstico de la brucelosis canina (Martín *et al.*, 1992). Una desventaja de este tipo de pruebas, es que no es muy extensa y en algunos casos no es específica para *B. canis*, obteniéndose así falsos positivos (Johnson y Walker, 1992). La muestra de sangre, se realizará con toda la asepsia posible, es necesario como mínimo 1 ml de suero para realizar la serología. Por medio de estas pruebas, los anticuerpos son detectados al agregar el antígeno a una muestra de suero, si están presentes los anticuerpos contra *B. canis*, formarán un conglomerado llamado aglutinación (Carmichael, 1976). La infección por *B. canis* produce anticuerpos que son detectables por diferentes pruebas serológicas a partir de las 8 semanas post-infección (Carmichael y Shin, 1996), y son producidos frente a los antígenos citoplasmáticos y de la pared celular de *B. canis*, los títulos de anticuerpos son detectados por arriba de 1:400 a 1: 3,200 como resultado de una bacteremia persistente. Si la bacteria llega a ser intermitente, los títulos disminuyen a 1:50-1:200, y en algunos animales, hay fluctuación de los títulos con la presencia o ausencia de bacteremia (Johnson y Walker, 1992). En forma similar a todas las infecciones por *Brucella*, en la primera fase de la respuesta inmune predomina la Ig M que va siendo paulatinamente superada por la Ig G, la cual caracteriza la respuesta del paciente crónicamente infectado (Carmichael y Shin, 1996).

Entre los problemas que presenta el serodiagnóstico de *B. canis*, son la contaminación de muestras, sueros hemolisados, sueros de perros tratados con antibióticos para combatir la infección, presentando así, incapacidad para detectar títulos bajos de infecciones crónicas (Carmichael, 1976); es por ellos que si se desea realizar una prueba serológica a estos animales, es necesario esperar aproximadamente 4 semanas después del cese del tratamiento (Carmichael, 1978). Muchas veces, los perros presentan títulos de anticuerpos insignificantes a pesar de presentar bacteremia, en tanto otros, dan resultados positivos como consecuencia de las reacciones heterólogas con otras bacterias (Martin *et al.*, 1992). Por tal motivo, el serodiagnóstico de *B. canis* es difícil ya que su morfología es de naturaleza rugosa y ello genera reacciones cruzadas entre la pared celular por su componente lipopolisacárido y éste a su vez con otras especies de bacterias (Carmichael y Joubert, 1987).

Esto sucede cuando se utiliza antígeno de pared celular, ya que la pared celular de *B. canis* no es única y presenta antígenos similares con otras bacterias como son *B. ovis*, *B. abortus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus sp.* generando así resultados falsos-positivos (Johnson y Walker, 1992).

Cuando los resultados son positivos o sospechosos en una prueba serológica, se deberá intentar aislar la bacterias a partir de sangre (Carmichael, 1976). Por otro lado, las pruebas serológicas se pueden realizar con o sin el uso del reactivo 2-mercaptoetanol (2ME) (Carmichael, 1978).

7.3.1. Prueba de Aglutinación en tubo (TAT)

Esta prueba es clásica para la brucelosis canina, es semicuantitativa, es menos sensible y más específica (Johnson y Walker, 1992). Requiere una suspensión preparada de *B. canis* (antígenos de pared celular) (Alton *et al.*, 1988), la cual se mezcla con la muestra de suero canino y se incuba a 50-52 °C, la aglutinación aparecerá pasadas 24-48 horas. Una aglutinación con diluciones bajas de 1:25 – 1:50 indica que el animal es “sospechoso” (Carmichael, 1976; Ramírez, 1978). Se considera que esta prueba con títulos de aglutinación de 1:100 o mayores son positivos debido a que los animales con estos títulos resultan frecuentemente positivos al aislamiento de *B. canis* en hemocultivos. Pero si a esta prueba se le agrega 2 mercaptoetanol, títulos de 1:200 o más son considerados positivos (Ramírez, 1978). Cuando las reacciones dan por resultado “falsos positivos” estos deberán ser confirmados a través de la prueba de Inmunodifusión (Carmichael, 1978), siendo así una prueba cuantitativa obteniendo resultados en poco tiempo (Johnson y Walker, 1992). El inconveniente que presenta es que los resultados demoran en obtenerse y en ocasiones puede ser difícil determinar si la aglutinación es completa o incompleta (Martín *et al.*, 1992), es por ello que esta prueba limita el diagnóstico de la brucelosis canina (Nicoletti, 1987) y por tanto debe considerarse como método serológico complementario (Alton *et al.*, 1988).

7.3.2 Prueba de Aglutinación Rápida en Placa (RSAT) (2ME-RSAT)

A diferencia de la TAT, ésta se realiza en una superficie lisa, con ella se obtiene un diagnóstico presuntivo en sólo unos minutos (Carmichael, 1976). Es rápida y de fácil realización (Nicoletti, 1987), posee alta sensibilidad (99.7%) pero menos especificidad (62.5%) encontrando así un margen alto de “falsos positivos” (Ramírez, 1978; Briseño, 1990). Detecta anticuerpos desde que se presenta la bacteremia (a partir de la segunda a tercera semana post-infección) y hasta que el animal se recupera (Carmichael, 1976), pueden usarse para este propósito: suero sanguíneo, humor acuoso y líquido seminal (Borie y Pinochet, 1987). El antígeno utilizado es una suspensión de *B. ovis* teñida con Rosa de bengala, que reacciona en forma cruzada con *B. canis*. Un resultado negativo es una evidencia fuerte de que el perro no está infectado, pero tan sólo 40% de los perros cuyo suero aglutina al antígeno de prueba resultan positivos a brucelosis

canina. Por lo tanto, los perros positivos a la prueba de aglutinación rápida en placa no deben ser considerados como infectados hasta que se realicen pruebas adicionales (Carmichael, 1996).

Cuando se adiciona 0,2 ml de mercaptoetanol (2-ME RSAT), es de utilidad para elaborar un diagnóstico presuntivo de infección, indicando así que los animales deberán ser monitoreados bacteriológicamente para así obtener un diagnóstico definitivo (Rodríguez *et al.*, 1994). El uso de 2-mercaptoetanol se basa en el hecho de que los anticuerpos Ig M se degradan debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tiol, tales como el 2-mercaptoetanol, la cisteína y el dithioeritrol, sin producir efectos sobre los anticuerpos Ig G, aumentando la especificidad de la prueba y por el sistema de titulaciones se convierte en una prueba cuantitativa que permite hacer un seguimiento de los niveles de anticuerpos. (Mc Mahon, 1983).

La mayoría de investigadores en los Estados Unidos sugieren que un título de 1/100 para la prueba de 2-mercaptoetanol es indicativo de infección; otros investigadores, incluyendo a la Comisión sobre Brucelosis de la Organización Mundial de la Salud, dicen que a partir de títulos de 1/200 se debe considerar un animal como positivo (Hubbert *et al.*, 1980); sin embargo, una ayuda muy valiosa en el diagnóstico es el examen de sueros pareados con intervalos de 8-12 semanas, para evaluar el incremento de títulos que se interpretaría como infección activa. (Carmichael y Shin, 1996). El mejoramiento de esta prueba incluye un RSAT que emplea una cepa mutante (menos mucoide M-) de *B. canis* que posea gran especificidad (M-RSAT) (Shin y Carmichael, 1999).

7.3.3 Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

La base de la prueba de IDGA es la concurrente migración de antígenos y anticuerpos a través del gel de agar. Cuando los antígenos y anticuerpos específicos entran en contacto, se combinan para formar un precipitado que se encuentra atrapada en el gel y produce una línea visible. La línea de precipitación se observa cuando la concentración de antígenos y anticuerpos es óptimo. Las diferencias en la concentración de los antígenos o anticuerpos cambiarán la ubicación de la línea hacia la cavidad con más baja concentración o resulta en la ausencia de una línea de precipitación. La concentración de electrolitos, el pH, la temperatura, y otras variables también afectan la formación de precipitado (Coll, 1993).

Es una de las pruebas serológicas más ampliamente utilizadas en el diagnóstico de *B. canis* en perros (Carmichael y Greene, 1998; Carmichael, 1998). La ID ha demostrado ser más sensible y específica que las pruebas de aglutinación y presenta la gran ventaja adicional de poder diferenciar las reacciones inespecíficas mediante pruebas de identidad. Su lectura se realiza a las 24, 48 y 72 horas, lo que sería una desventaja en exámenes previos a la cruce (Borie y Pinochet, 1987). Los anticuerpos precipitantes aparecen desde la segunda a tercera semana post-infección. En esta prueba los anticuerpos pueden ser detectados a partir de las 8 a 12 semanas después de la infección y persisten durante varios años (Carmichael y Greene, 1998). Con el objetivo de disminuir el número de reacciones falso positivas en la IDGA, se realiza un tratamiento previo de los sueros con 2-mercaptoetanol (2-ME) (Keid, 2001). El 2-ME desnaturaliza la Ig M mediante la destrucción de los puentes disulfídicos. La molécula de Ig M tiene una mayor característica de aglutinación no específica que la molécula de Ig G y, de esa forma, el empleo de 2-mercaptoetanol reduce el número de reacciones inespecíficas (Johnson y Walker, 1992; Carmichael y Shin, 1996).

Existen dos métodos de IDGA: el que utiliza antígenos de pared celular (IDGA – LPS – *B. canis* y *B. ovis*) y el que utiliza antígenos de proteínas citoplasmáticas (IDGA – PC – *B. canis*) (Carmichael, 1990; Carmichael, 1998; Carmichael y Greene, 1998).

El IDGA – LPS no es tan fácilmente utilizable cuando se usa también R-SAT o la TAT, pues la preparación del antígeno y la lectura de los resultados son más complejos. Aún siendo más

especifico que 2ME- RSAT, las reacciones cruzadas con otros microorganismos puede ocurrir. Además de ese hecho, la interpretación del resultado es subjetiva, por eso no se emplea como método cuantitativo.

La prueba de inmunodifusión utilizando antígeno citoplasmático (IDGA-PC), actualmente, es el método más específico para la detección de *Brucella sp.* de tipo rugosas. Utiliza extracto proteico del citoplasma bacteriano de *B. canis*. (M-) y presenta menor proporción de reacciones cruzadas. Una gran ventaja de la IDGA utilizando antígenos citoplasmáticos es la posibilidad de diagnosticar animales crónicamente infectados, permitiendo la detección de anticuerpos circulantes hasta 36 meses después de la bacteremia ha cesado cuando otras pruebas presentan resultados negativos (Johnson y Walker, 1992). En tanto, en infecciones recientes, el diagnóstico por la IDGA no es recomendable, pues los anticuerpos circulantes son detectados solamente a partir de 8-12 semanas después de la infección, o sea, 4 semanas más tarde que la detección usando R-SAT 2ME. (Johnson y Walker, 1992; Carmichael, 1998; Carmichael y Greene, 1998)

Como los antígenos citoplasmáticos de *B. canis* serán comunes a otras especies de *Brucella*, el IDGA-PC presenta reacciones positivas cuando las infecciones son causadas por *B. suis*, *B. abortus* y *B. ovis*. Aún así, ese hecho no es de gran interés clínico, pues las infecciones por otras brucelas raramente ocurre en perros (Minharro *et al.*, 2005).

La IDGA – *B. canis* utilizado en paralelo con la IDGA – *B. ovis* aumenta la eficacia y la confiabilidad de diagnóstico serológico de brucelosis canina, pudiendo ser recomendado como examen confirmatorio para el diagnóstico de la enfermedad (Minharro *et al.*, 2005).

7.3.4 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Detecta anticuerpos frente a *B. canis*, careciendo de algunos de los inconvenientes que presentan las pruebas anteriores, es decir, la formación de autoaglutinación espontánea de los antígenos; ésta ventaja, más la facilidad de realización, así como el gran número de muestras que se pueden procesar, da por resultado una técnica muy valiosa para la detección de animales con *B. canis* (Gómez *et al.*, 1990). Esta prueba es muy específica y más sensible que las pruebas serológicas anteriores (Johnson y Walker, 1992). Como antígeno se emplea una suspensión de *Brucella canis*, inactivada por calor (70° C por 1 hora), normalizada a una densidad óptica de 0.5 a 700 nm. Se considera positivo cuando el valor de la densidad óptica supera 2 o 3 veces el promedio de la densidad óptica de las muestras tomadas como controles negativos (Gómez *et al.*, 1990).

Mateu y Martín-Castillo en 1993 aplicaron la prueba de ELISA a 177 muestras de suero, con el objetivo de diagnosticar la brucelosis canina, comparándola con otras pruebas como la R.F.C. (reacción de fijación de complemento), 2-ME (mercaptoetanol), y S.A.L (seroaglutinación lenta), resultando la prueba de ELISA más específica con un 95% de efectividad.

7.3.5 Prueba de Anticuerpo Fluorescente Indirecto (IFAT)

Esta prueba tiene la particularidad que se aplica actualmente necesitando recursos diagnósticos más sofisticados y eficientes, que generalmente no están al alcance de muchos países. La prueba de IFAT es utilizada por varios laboratorios de diagnóstico en los EEUU, pero la información sobre su exactitud no ha sido publicada. Los resultados del Laboratorio de Diagnóstico de la Universidad de Cornell indican una tasa alta de reacciones falsopositivas con la aplicación de esta técnica (Alton *et al.*, 1988).

Las pruebas que se usan en el diagnóstico serológico con sus características de antígeno, tiempo a partir del cual será más confiable y sus comentarios de especificidad y sensibilidad se resumen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Pruebas Serológicas empleadas para el Diagnóstico de *B. canis*

Test Serológico	Antígeno	Tiempo Marco para Resultados Positivos	Comentarios
2-Mercaptoetanol-aglutinación rápida en placa (2-ME RSAT) con <i>B. ovis</i> o <i>B. canis</i>	Pared celular	Aprox. 5-8 semanas posinfección hasta 3 meses después de que el animal es abacterémico	Muy sensible; falsos positivos son comunes; Pocos falsos negativos (1%); rápida, barata y fácil.
2-Mercaptoetanol-aglutinación en tubo (2-ME TAT)	Pared celular	Similar a 2-ME RSAT	Semicuantitativa, son posibles resultados falsos-positivos
Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)	Pared celular	Similar a 2-ME RSAT, los anticuerpos pueden ser detectables 1 a 2 semanas más temprano, hasta 4 meses después e que el animal es abacterémico.	Muy sensible; difícil de interpretar; las reacciones de precipitación no específicas, son comunes.
Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)	Proteínas citoplasmáticas	Aprox. 8-12 semanas posinfección hasta 36 meses después que el animal es abacterémico.	Altamente específico pero menos sensible, detecta casos crónicos (aún cuando otras pruebas lo reportan como negativo) e infecciones por otras brucellas.
ELISA	Pared celular	Desconocido (el tiempo esperado debe ser similar al observado con prueba de aglutinación rápida en tubo)	Muy específico, menos sensible que la prueba de aglutinación rápida en tubo, la disponibilidad es limitada.
Inmuno-fluorescencia (IFAT)	Pared celular	Desconocido	No hay datos publicados; aparentemente menos sensible que 2-ME-TAT

Fuente: Carmichael y Shin, 1996

7.4 Diagnóstico bacteriológico

Este tipo de diagnóstico se basa en el aislamiento de *B. canis* a partir de tejido o sangre infectada (Johnson y Walker, 1992). Si se logra aislar el organismo a partir de sangre (hemocultivo) u otro tejido, el diagnóstico se da como positivo definitivo (Martín *et al.*, 1992) (Cuadro 7).

Cuadro 7: Órganos utilizados para aislar *B. canis*

Órgano	Crecimiento
G. linfáticos:	
Retrofaríngeos	++++
Inguinales	+++
Mesentéricos	++
Bazo	++++
Médula ósea	+++

Hígado	+++	
Próstata	+++	
Epidídimo		++
Testículos		+

Tejido fetal y tejido maternal abortado:

Placenta	++++	
Líquido alantoideo	++++	
Hígado	+++	
G. L. Mesentérico	+++	
Pulmones	++	

- + *aislamiento pobre de microorganismos*
- ++ *aislamiento moderado de microorganismos*
- +++ *aislamiento alto de microorganismos*
- ++++ *aislamiento muy alto de microorganismos*

Fuente: Ramírez, 1978

7.4.1 Aislamiento

En hembras, el aislamiento de los microorganismos a partir de descargas vaginales post-parto es una muestra ideal, ya que persisten por varios días (Johnson y Walker, 1992). Los hisopados vaginales una vez ha cesado la descarga no contienen la bacteria (Moore, 1969). También se puede realizar el aislamiento en una perra que acaba de abortar efectuándose un cultivo vaginal si *B. canis* fue la causa del aborto, el cultivo es positivo, a la vez esta prueba carece de validez cuando la muestra se toma de una perra que está en la fase de anestro donde los resultados son negativos en presencia o ausencia de infección a *B. canis*. Cuando se pretende aislar *B. canis* a partir de muestras de semen, la mayor sensibilidad se tiene entre la tercera y octava semana después de la infección, a partir de la semana 12 el número de microorganismos en el eyaculado va disminuyendo y muy probablemente a la semana 60 el cultivo será negativo a pesar de que el animal continúe infectado. Una muestra de epidídimo para aislar *B. canis* es positivo antes de la semana 35 (generalmente 2 meses posteriores del cese de la bacteremia), pero si se realiza a partir de la semana 35-60 el resultado no es muy bueno, y pasadas más de 100 semanas el resultado es completamente negativo, a diferencia de una muestra de próstata, donde el cultivo puede realizarse alrededor de la semana 64 post-infección obteniéndose un resultado positivo (Johnson y Walker, 1992).

El hemocultivo debe realizarse siempre que se sospeche la enfermedad, sin olvidar que ésta puede existir en forma intermitente y que en los casos crónicos la infección puede encontrarse localizada en 1 o 2 tejidos. (Shin y Carmichael, 1999). Un resultado de hemocultivos negativos no debe ser considerado como definitivo. Por lo general los animales infectados poseen altos niveles de anticuerpos circulantes que persisten por varios meses después de que la bacteremia ha cesado.

El hemocultivo es la mejor prueba diagnóstica para infecciones tempranas, teniendo en cuenta que en las 4 primeras semanas post-infección las pruebas serológicas y los cultivos de semen y orina son aún negativos (Johnson y Walker, 1992). A partir de la segunda a cuarta semana de haber adquirido la infección, un hemocultivo presenta buenos resultados, el cual puede prolongarse hasta la semana 30 (Johnson y Walker, 1992), aunque la mayoría de los perros infectados (más del 50%) tienen bacteremias que duran hasta 1 año ó más (Shin y Carmichael, 1999). Por otra parte, la bacteremia llega a ser intermitente en infecciones crónicas, lo que indica que un bajo porcentaje de perros infectados presente un cultivo sanguíneo positivo después de 58 meses. Es así que el hemocultivo es un medio de diagnóstico ideal para detectar las infecciones tempranas, esto es, a partir de la segunda semana post-infección donde se ha descubierto que el número de organismos en sangre es de 10^3 microorganismos/ml. Un cultivo sanguíneo no excluye la posibilidad de infección a *B. canis*, especialmente en casos de infección crónica.

A causa de la localización intracelular de *B. canis* en el sistema retículo-endotelial, el organismo puede ser aislado a partir de médula ósea, por aspiración, en ausencia de un cultivo sanguíneo positivo (Johnson y Walker, 1992).

En períodos abacterémicos, el cultivo de orina es una alternativa al hemocultivo, especialmente en los machos (Borie y Sánchez, 2002). El aislamiento de la orina es válido entre las semanas 8-30 donde *B. canis* es eliminada en orina (10^5 organismos/ml) (Johnson y Walker, 1992). Se puede realizar cultivo a partir de nodos linfáticos, bazo, médula ósea, fetos abortados, placenta, fluido alantoideo, pulmón e hígado. Cuando la infección induce la presentación de uveítis, un cultivo del humor acuoso puede resultar positivo (Johnson y Walker, 1992) (Cuadro 8).

Las muestras se recolectarán empleando la técnica adecuada, aséptica, y transportándolo al laboratorio en un medio apropiado para prevenir el crecimiento de contaminantes.

Cuadro 8: Diagnóstico de Confirmación a infección por *B. canis* a través de un cultivo

<i>Material para cultivo</i>	<i>Tiempo para realizar el cultivo</i>	<i>Resultados</i>
Descargas post-aborto y Placenta	Cuando están presentes 3-11 semanas PI	Positivo Positivo
Semen	12-60 semanas P.I + de 60 semanas PI	Positivo Negativo
Sangre	5-30 semanas PI 6-12 meses PI 28-48 meses PI 48-58 meses PI + 58 meses PI	100% Positivo + 80% Positivo 50-80% Positivos 25-50% Positivos - 25% Positivos
Epidídimo	35-60 semanas PI +100 semanas PI	50-100% Positivos Negativo
Orina	8-30 semanas PI	Generalmente Positivo
Próstata	Hasta 64 semanas PI	Generalmente Positivo
Ganglios linfáticos, Bazo	Cuando el animal presenta bacteremia	Generalmente Positivo
Médula ósea	Cuando el animal no presenta bacteremia	Positivo o Negativo
Ojo	Solo cuando se presenta uveítis	Generalmente Positivo
Disco intervertebral	Cuando se presenta discoespondilitis	Positivo o Negativo

PI: post-infección

Fuente: Johnson y Walker 1992

8. Diagnóstico diferencial

Se debe realizar con aquellas enfermedades que presenten signos clínicos como: abortos, infertilidad, lesiones testiculares, e hiperplasia de nódulos linfoides (Ramírez, 1978). Para esto, a continuación se mencionan algunas enfermedades que presentan signos clínicos sugestivos a brucelosis canina, de tal manera que no se menciona todo el cuadro clínico de las enfermedades, solamente se citan lo signos que suele presentar la brucelosis canina.

8.1 Linfadenopatía

La linfadenopatía es un aumento de tamaño o cambio en la consistencia de un ganglio linfático; los cambios pueden ser regionales o generalizados dependiendo del proceso patológico (Fenner, 1994). De tal manera, que el diagnóstico diferencial de brucelosis canina se deberá realizar con todos los trastornos que cursen con un cuadro de linfadenopatía generalizada ya que *B. canis* presenta este cuadro (Cuadro 9).

El diagnóstico diferencial, en caso de abortos, se hace con *Streptococcus β hemolítico*, *Escherichia coli* hemolítica y *Varicellovirus* (Herpesvirus canino) dependiendo de si hubo aborto, muerte neonatal o nacidos muertos a término (Moore, 1969).

Cuadro 9. Enfermedades que cursan con linfadenopatía generalizada.

<i>Bacteriana</i>	<i>Hongos</i>	<i>Ectoparásitos</i>	<i>Neoplasias</i>	<i>Otras</i>
Piodermas	Histoplasmosis	Demodicosis	Linfosarcoma	Toxoplasmosis
Septicemias	Blastomicosis	Sarna sarcóptica	Metástasis	Erlichiosis
Brucelosis	Coccidioido-micosis	Pulgas	Enfermedad mieloproliferativa	Envenenamiento con salmón
				Lupus eritematoso sistémico
				Artritis reumatoide

Fuente: Fenner, 1994

8.2 Transtornos relacionados con aborto

8.2.1 Traumatismos

8.2.2 Inanición o desnutrición en la madre

8.2.3 Toxoplasmosis

El can puede presentarse asintomático, o bien presentar adenopatías, bronconeumonía, gastroenteritis, encefalitis, paresias, glaucoma y esplenomegalia; las hembras difícilmente llegan a concebir, si lo logran se presenta aborto. Generalmente se ven más afectados los perros jóvenes que los adultos (Niemand, 1981).

8.2.4 Hepatitis canina

Producida por Adenovirus tipo 2. Produce apatía, inapetencia, conjuntivitis serosa, amigdalitis, aumento del tamaño en los ganglios linfáticos submandibulares y submaxilares, dolor en la región xifoidea, fiebre 41 °C, nefritis, hepatomegalia y esplenomegalia. Si hay intervención de bacterias secundarias, en hembras gestantes puede haber abortos. Por otro lado, hay muerte repentina (24 horas) de los cachorros (Niemand, 1981).

8.3 Infertilidad en la hembra

8.3.1 Reabsorción fetal

Es sugestiva de una deficiencia hormonal básica o vascular, así como de un proceso infeccioso. Si hay reabsorción repetida, se puede pensar en factores genéticos letales (Jones y Joshua, 1988).

8.3.2 Endometritis bacteriana

Posiblemente sea la causa más común de infertilidad en las hembras, es decir, la perra presenta sus ciclos normales e incapacidad para concebir, tal vez hay historias de nacimientos de crías muertas, o bien la presentación de aborto (Fenner, 1994).

8.3.3 Vaginitis bacteriana

Llega a ser asintomática, puede ocurrir por un amplio rango de bacterias, lo que hace que sea una principal causa de infertilidad en la hembra. La vaginitis asociada con cistitis puede ser concurrente, de naturaleza crónica, se presenta irritación y micción frecuente (Jones y Joshua, 1988).

8.3.4 Hormonales

El hipotiroidismo en las hembras está asociado con fallas en la concepción, falta de ciclos estruales y de fertilidad, además de presentar manifestaciones clínicas aparentes como cambios en la piel, obesidad y alopecia (Fenner, 1994).

8.4 Infertilidad en el macho

Puede ser ocasionada por problemas anatómicos, como lesiones congénitas, entre ellas: persistencia del frenillo del pene (fimosis), deformidad en el hueso peneano, adhesión del prepucio, estenosis uretral, la cual provoca emisión seminal retardada.

En la infertilidad fisiológica, la duración de la espermatogénesis depende del tránsito epididimal necesario para la maduración, afectándole así, los cambios fisiológicos temporales de la naturaleza, administración de drogas, hipertermia, donde la fase meiótica de la espermatogénesis es muy sensible a daño tanto químico como calorífico, provocando infertilidad temporal; o bien, problemas autoinmunes ocasionados por problemas inflamatorios agudos en el testículo, donde la integridad de los túbulos seminíferos es alterada exponiendo al sistema inmune a antígenos espermáticos para iniciar respuestas humorales mediadas por células, constituyendo una reacción autoinmune a los espermatozoides y células espermatogénicas (Jones y Joshua, 1988).

8.4.1 Hormonales

La administración de drogas ya sea intencional o accidentalmente (metil testosterona vía oral, estrógenos, progesterona), pueden actuar sobre las células de los túbulos seminíferos y epidídimo, afectando la producción y maduración de los espermatozoides, o bien, interfiriendo en la producción de andrógenos de los cuales depende la meiosis como la fase epidimal, o afectando directamente a las células de Leydig, e indirectamente interfieren con la disminución de la liberación de LH (Jones y Joshua, 1988).

El hipotiroidismo en machos se puede manifestar por falta de libido y disminución en el número de espermatozoides (Niemand, 1981; Jones y Joshua, 1988).

8.4.2 Genéticos

Las anomalías cromosómicas como el Síndrome de Klinefelter, donde se da la presencia de por lo menos 2 cromosomas X en el cromosoma complementario de un macho evidente, ocasiona que en los perros afectados esté disminuida o inexistente la función espermatozoaria (Jones y Joshua, 1988).

8.4.3 Orquitis y Epididimitis

Por lo general, se presenta simultáneamente. Puede originarse por traumatismos, o procesos tóxico-infecciosos en estado agudo. Los testículos aumentan de volumen, son más calientes y sensibles al dolor, los perros prefieren estar echados, con las patas abiertas y tiesas, dando la impresión de presentar paresia, en estados crónicos, los testículos y el epidídimo se vuelven duros, no hay sensibilidad al dolor, confundiendo con tumores, a diferencia de la brucelosis canina que presentan abscesos y necrosis (Niemand, 1981).

9. Pronóstico

Se considera grave (Berthelot y Garin, 1993), debido a los problemas que ocasiona en el tracto reproductor; es decir, esterilidad en los machos (atrofia testicular), así como fallas para concebir en las perras; sin embargo, perros infectados por *B. canis*, sobreviven por un período prolongado lo que hace que esta enfermedad sea de curso crónico (Berthelot y Garin, 1993; Fenner, 1994).

10. Tratamiento

El tratamiento no se recomienda para perros de criaderos, y donde los perros no puedan ser aislados y monitoreado con precisión después de la terapia con antibióticos ([Johnson y Walker, 1992](#)). El tratamiento con antimicrobianos, aunque pueda erradicar la bacteria del organismo, los daños a nivel genital permanecen de manera irreversible, lo que implica que cualquier perro seropositivo a esta bacteria debe inevitablemente ser eliminado como reproductor ([Carmichael y Greene, 1993](#)).

Un tratamiento ideal y efectivo debe eliminar completamente a *B. canis* del cuerpo (Carmichael, 1978), actualmente no existe un tratamiento 100% eficaz para combatir la brucelosis canina, ya que los animales que son tratados pueden quedar como portadores sanos, y ser fuente de infección a otros animales incluyendo el humano (Johnson y Walker, 1992). Sin embargo, el tratamiento debe ser considerado como alternativa a la eutanasia en perros infectados, sobre todo en los animales de compañía, ya que existe un predominio sobre los valores emocionales del dueño hacia la mascota (Flores y Carmichael, 1981). Se cree que la castración en ambos sexos reduce el riesgo de transmisión por perros infectados; no obstante, esta hipótesis no se ha probado experimentalmente y la castración no elimina a los organismos del cuerpo. Todos los perros castrados deben recibir un tratamiento de antibióticos (Shin y Carmichael, 1999).

B. canis es sensible a un gran número de antibióticos, los más importantes son los del grupo de las tetraciclinas y los de la clase de aminoglucósidos debido a que presentan un 94% de efectividad (Sharon *et al.*, 1992) y en menor proporción al cloranfenicol, rifampicina y sulfonamidas (Nicoletti, 1987; Briseño, 1990). Se ha demostrado que este organismo presenta susceptibilidad a la acción de diferentes antibióticos; sin embargo las altas concentraciones que se utilizan *in vitro* no son satisfactorias *in vivo* (Flores y Carmichael, 1981).

El éxito del tratamiento es variable, y los fracasos que se presentan son debido a la localización intracelular de *B. canis*, sobre todo los localizados en el sistema retículo endotelial, donde los antibióticos no tiene acceso para actuar intracelularmente (Borie y Sánchez, 2002). El tratamiento ideal es aquel que presenta una respuesta favorable en corto tiempo, sólo que la presentación de la bacteremia se puede repetir después de unos meses si se suspende la terapia antibiótica (Nicoletti, 1991). Es por ello que se cree que los canes se “recuperan” eventualmente.

El tratamiento de la brucelosis canina es intensivo y prolongado, dura de 2 a 3 semanas o más (Carmichael, 1978). Cabe mencionar que los animales que son sometidos a tratamiento, a menudo, sufren recaídas con periodos de bacteremia después de unas semanas o meses posteriores a la fecha de terminación de la terapia, posiblemente por indiferencia (Flores y Carmichael, 1981). Se considera como tratamiento exitoso, cuando el cultivo sanguíneo y el cultivo de diferentes tejidos, así como pruebas serológicas, presentan resultados negativos pasadas 6 a 28 semanas posteriores al tratamiento del paciente, ya que existe una eliminación completa de *B. canis* (Nicoletti, 1987). Se tienen conocimientos de que los animales se recuperan antes de seis a nueve meses seguidos de haber iniciado el tratamiento (Zoha, 1982).

La terapia antibiótica es más eficiente en hembras infectadas que en los machos, debido a que el foco de infección en los machos está presente en el tracto reproductor sobre todo en el epidídimo y próstata, dificultando así la eliminación de estos organismos; presentándose una esterilidad irreversible en machos sometidos a tratamiento (Nicoletti, 1987). Por el contrario, la probabilidad de aborto disminuye en las hembras si se administra una terapia antibiótica durante la gestación, de lo contrario, éstas transmitirán la infección a sus descendientes si es que sobrevive. Si se desea un buen éxito terapéutico es necesario realizar una terapia antibiótica temprana, esto se logra realizando un diagnóstico definitivo de infección inmediatamente que el paciente adquiere la infección (Nicoletti, 1987). Ya que al parecer aumenta la posibilidad de obtener un tratamiento exitoso cuando éste se realiza al principio de la infección de lo contrario disminuirán las posibilidades en el caso de infecciones crónicas, si se pretende realizar un tratamiento a un paciente de compañía, es necesario castrarlo para así tener buena respuesta antibiótica (Briseño, 1990). Para ello, la ampicilina y la tetraciclina se comportan como bacteriostáticos, al suspender el tratamiento aparece nuevamente la bacteremia (Nava, 1993). Aquí se describen diferentes experiencias con diferentes antibióticos:

- Ramírez (1978), administró oxitetraciclina micronizada insoluble a razón de 12.5 mg/kg cada 24 horas vía subcutánea durante seis semanas.
- Zoha (1982), utilizó un tratamiento con oxitetraciclina 20 mg/kg de peso, intramuscular durante 4 semanas; en combinación con estreptomycin a dosis de 15 mg/kg de peso, cada 24 horas durante 7 días.
- Briseño (1990), menciona un tratamiento ideal para combatir la brucelosis canina, empleando tetraciclinas a dosis de 19 mg/kg de peso cada 24 horas durante 4 semanas, y

recomienda reforzar dicho tratamiento con estreptomycin a razón de 4.5 mg/kg de peso cada 12 horas los 7 primeros y los últimos 7 días del mismo.

- Sharon *et al* (1992), reportan las quinolonas como alternativa para tratar la brucelosis canina, sobre todo si está asociada a disco espondilitis; ya que se encontró que esta terapia alcanza altas concentraciones terapéuticas en neutrófilos, macrófagos y glándula prostática, además tienen una buena penetración en el hueso, a dosis de 2.5 mg/kg (Baytril inyectable 5%, Bayer), es por ello el empleo de las quinolonas en padecimientos como lo es la osteomielitis.

Un tratamiento que garantiza un 80% de efectividad es la administración en la primera semana de tetraciclinas a una dosis de 15-20 mg/kg vía intramuscular cada 12 horas. Finalmente a partir de la cuarta semana la administración de ambos antibióticos (Nava, 1993).

Los resultados más exitosos y prácticos se obtuvieron con una combinación de tetraciclina como el hidrocloreuro de tetraciclina (22mg/Kg VO c/8 hs) la doxiciclina, (10mg/Kg VO c/12 hs-24 hs), la minociclina (10mg/Kg VO c/12 hs-24 hs) y la estreptomycin (10mg/Kg VO c/12 hs-24 hs) administrada durante los primeros 3 meses de infección. Se han obtenido tasas de más del 80% de curación en criaderos, en donde los perros inicialmente diagnosticados como infectados eran sacrificados y en casos tempranos fueron tratados (Shin y Carmichael, 1999). También se ha descrito el uso de enrofloxacin (5 mg/Kg VO c/12 hs) por 30 días en perras infectados en diferentes estados del ciclo sexual, mostrando que posterior a este tratamiento se mantuvieron negativas a la prueba RSAT durante 14 meses, tiempo que duró el estudio. (Wanke, 2006; Rev. Ciencia Veterinaria, 2006). Las combinaciones más utilizadas son doxiciclina (15-25 mg/Kg Po c/12 hrs) y dihidroestreptomycin (5 mg/Kg IM c/12 hrs) por 11 semanas, o la combinación doxiciclina – gentamicina a dosis de 15 mg/Kg VO c/12 horas y 2 mg/Kg IM c/12 hs respectivamente (Carmichael y Greene, 1993).

Existen así, una variedad de quimioterapéuticos (tetraciclinas y aminoglucósidos) y dosis empleadas en el uso de antibióticos, esto se debe a las diferentes combinaciones de drogas antimicrobianas empleadas para eliminar completamente *B. canis* del cuerpo, así como a los ensayos realizados por diferentes investigadores.

Los antibióticos empleados y esquemas terapéuticos para combatir la brucelosis canina descritos por diferentes autores, que han tenido buena respuesta terapéutica son citados en los cuadros 10 y 11, también se menciona dosis, duración del tratamiento, etc.

Cuadro 10. Efectividad de algunos esquemas terapéuticos

Esquema de tratamiento	Dosis total/día(mg/kg)	Duración (días)	Fallas	Exitos
Tetraciclina	14.0	14	5/5	0/5
Tetraciclina y Sulfa-Trimetoprim	14.0	14	3/3	0/3
Rifampicina, Demociclina y Estreptomycin	44.0	8	2/5	3/5
Minociclina y Estreptomycin	27.0	14	3/18	15/18
	11.0	14		

Tetraciclina,	20.0	14	3/6	3/6
Estreptomicina y	11.0	14		
Sulfa-Trimetropim	15.0	14		

Fuente: Flores y Carmichael, 1981

Cuadro 11. Quimioterapia de la brucelosis canina

Antibiótico	Dosis por kg de peso	Vía	Duración del Tratamiento	Tomas por día
<u>En combinación:</u>				
Minociclina,	10 mg/kg	Oral	14 días	1 vez/día
Estreptomicina	4.5mg/kg	Intramuscular	7 días	2 veces/día
<u>En combinación:</u>				
Oxitetraciclina	20 mg/kg	Intramuscular	3 semanas	1 vez/día
Estreptomicina	15 mg/kg	Intramuscular	7 días	2 veces/día
*Ampicilina	250 mg/kg	Oral	21 días	3 veces/día
<u>En combinación:</u>				
Tetraciclina	250 mg/kg	Oral	21 días	3 veces/día
Estreptomicina	250 mg/kg	Intramuscular	21 días	2 veces/día
*Tetraciclina	250 mg/kg	Oral	21 días	3 veces/día
<u>En combinación:</u>				
Tetraciclina	250 mg/kg	Oral	21 días	3 veces/día
Estreptomicina	25m mg/kg	Intramuscular	21 días	2 veces/día
<u>En combinación:</u>				
**Tetraciclina	30 mg/kg	Oral	14 días	2 veces/día
Estreptomicina	20 mg/kg	Intramuscular	14 días	1 vez/día
<u>En combinación;</u>				
Minociclina	25 mg/kg	Oral	14 días	1 vez/día
Dihidroestreptomina o Gentamicina	5 mg/kg	Intramuscular	7 días	2 veces/día
<u>En combinación:</u>				
Tetraciclina	2 mg/kg	Intramuscular	7 días	2 veces/día
Dihidroestreptomina	22 mg/kg	Oral	28 días	3 veces/día
micina	5 mg/kg	Intramuscular	7 a 28 días	2 veces/día
* En esta terapia antibiótica, se suministran dos tratamientos, es decir, primero se administra un antibiótico solo, posteriormente se aplica un segundo tratamiento esto es, la combinación de ambos.				
** Después de recibir la terapia de antibióticos, la tetraciclina se administró sólo por un periodo de 14 días (Nicoletti 1991)				

Fuente: Carmichael y Greene, 1993; Nicoletti, 1991

11. Inmunidad y prevención

Se ha intentado inmunizar a los perros contra la brucelosis canina, a partir de vacunas con organismos muertos de *B. canis*; sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado una respuesta satisfactoria de inmunidad hacia los perros (Carmichael y Kenney, 1970).

Experimentalmente, Carmichael y Kenney (1970), lograron inmunizar a los perros con becterinas, esto se logró utilizando una suspensión de organismos, y un adyuvante completo o incompleto Freund logrando una inmunidad de hasta de 6 meses. Por otro lado, utilizaron un adyuvante comercial preparado con *Brucella* de tipo rugoso (*Brucella abortus* 45/20), los resultados fueron “exitosos”, el inconveniente que se presentó fue la manifestación de reacciones severas, como lo son la inflamación y abscesos, así como el desprendimiento de piel por necrosis ocasionada en el sitio de aplicación de la bacterina; por tal motivo, sugirieron evitar el empleo de estas en perros.

Un aspecto interesante de la infección es el hecho de que los perros suelen recuperarse en forma espontánea 3 o 4 años después de adquirir la infección. Estos animales mantienen siempre títulos bajos de anticuerpos ($> 1:25$), aun cuando la bacteria no ha podido ser aislada de los tejidos de estos animales. Cuando estos perros son desafiados con cepas patógenas, se observa que son sumamente resistentes. En contraste, cuando la infección se elimina en forma total en perros tratados con antibióticos, los anticuerpos desaparecen completamente en un lapso de 30 a 60 días, y los animales son víctimas de la infección al ser desafiados con cepa patógena (Borie y Sánchez, 2002). Esto sugiere que durante el proceso de recuperación espontánea debe persistir antígeno de *B. canis* en algún sitio del animal, lo que permite una constante estimulación del sistema inmune.

Lo anterior debe considerarse al intentar desarrollar vacunas para prevenir la enfermedad, puesto que se ha demostrado que la vacunación con una cepa mucoide (M-) y poco patógena de *B. canis* confiere una buena inmunidad siempre y cuando se aplique en dosis suficientemente elevadas para propiciar la bacteremia de la cepa vacunal; cuando la bacteremia no ocurre, la protección conferida es muy leve (Flores, 1978). La cepa vacunal M-, a pesar de persistir en fase bacterémica, no parece causar alteración de tipo patológico en animales vacunados; sin embargo, la persistencia de este germen en el torrente sanguíneo no permite que se pueda recomendar en forma intensiva. Actualmente la vacuna M- se está usando en forma experimental, con el objeto de determinar las vías, dosis y edad más adecuadas de vacunación.

Actualmente el desarrollo de vacunas está considerado como indeseable ya que las vacunas contra *Brucella* estudiadas confirieron sólo una moderada protección y los perros vacunados desarrollaron anticuerpos que podrían confundir el serodiagnóstico (Shin y Carmichael, 1999).

Es así que hasta la fecha, no hay biológicos efectivos para inmunizar y evitar la enfermedad (Johnson y Walker, 1992). Se espera que en un futuro haya una vacuna efectiva, que pueda desarrollar inmunidad, para así prevenir la diseminación de la enfermedad.

12. Control

La brucelosis canina es una enfermedad difícil de controlar, sobre todo en poblaciones comerciales porque existe una diseminación rápida de animales susceptibles (Jones y Emerson, 1984).

B. canis es una bacteria que se multiplica en el útero gestante, los organismos son eliminados junto con el neonato en el momento del parto, en las descargas uterinas días después al aborto o nacimiento; estos organismos son eliminados fácilmente en pocos días cuando se expone a la luz directa del sol o un ambiente seco. Los animales infectados pueden pasar desapercibidos, sin embargo, pueden estar diseminando la enfermedad. Para el control de la brucelosis se debe realizar:

- El diagnóstico de la infección
- Prevención del contacto directo o indirecto de animales libres de enfermedad y animales infectados o instalaciones, equipo, alimento o vehículos contaminados.

Es difícil evitar el contacto entre animales sanos y enfermos. La manera más fácil y económica de evitarlo es separar a los animales enfermos y expuestos de los animales clínicamente sanos. A los animales sospechosos se les da un tratamiento curativo y se les mantiene aislados hasta que se les considere libres de infección, al mismo tiempo, todas las instalaciones contaminadas tendrán que ser limpiadas y desinfectadas. Este procedimiento tiende a erradicar la enfermedad

al eliminar el agente infeccioso en el mismo lugar donde prolifera, ya que al dejar a los animales sanos en las áreas contaminadas, la exposición continúa y se presenta la posibilidad de una infección diseminada incluso hacia áreas donde no se había presentado. El mejor procedimiento es el sacrificio de todos los animales infectados (Shin y Carmichael, 1999).

Generalmente el control y la prevención de *B. canis* está enfocado a las explotaciones de cría comercial. Para ello, es necesario establecer procedimientos para poder erradicar la enfermedad del criadero (Johnson y Walker, 1992). Como medidas de control se considera:

- Elaborar programas de cuarentena (2-3 meses) a todos los animales de ingreso nuevo.
- No se permitirá la entrada de animales sanos hasta que sea confirmada la erradicación de la brucelosis canina (Johnson y Walker, 1992).
- Realizar la separación de animales sanos (Russel *et al.*, 1982).
- Aislamiento inmediato de perros con inflamación de nódulos linfáticos, así como hembras con presentación de aborto, descarga vaginal, y machos que presenten epididimitis (Segura, 1976).
- Realizar pruebas serológicas mensuales, hasta que los resultados sean negativos (porque en los animales infectados persisten los anticuerpos por más tiempo que la bacteremia), para que puedan ser admitidos (Johnson y Walker, 1992). Para ello se tomaran muestras de sangre a todos los perros del criadero para efectuar pruebas serológicas (Briseño, 1990), de esta manera se detectan anticuerpos frente a la *B. canis*, sobre todo a los machos que aparentemente están sanos (es decir no presentan manifestaciones clínicas), ya que a diferencia de las hembras el aborto puede ser sugestivo de infección. Las pruebas serológicas con título de aglutinación de 1:100 o superiores, son indicativas de que el perro tendrá que ser eliminado del criadero y aquellos que presenten títulos inferiores a 1:100 se muestrearan mensualmente mínimo durante tres ocasiones (Briseño, 1990).
- Identificación y exterminación de animales infectados por medio de la eutanasia a aquellos que presentaron un resultado positivo a las pruebas serológicas o cultivo (Johnson y Walker, 1992).
- Los locales diariamente serán aseados con agua y jabón y posteriormente desinfectados con compuestos yodóforos, cuaternarios de amonio o soluciones de cloro (Johnson y Walker, 1992). Para la desinfección de jaulas contaminadas así como el manejo de perros infectados, esto se deberá hacer con guantes desechables y mascarar quirúrgicas (Ramírez, 1978).
- No se permitirá la entrada al criadero a perros que se hayan recuperado parcialmente, durante el transcurso que permanecieron aislados (Ramírez, 1978).
- Se debe contar con ropa y batas por separado para los trabajadores así como para los médicos veterinarios para cada sección del criadero, es decir, al ingresar al criadero o a una

sección de éste; se permitirá la entrada al personal siempre y cuando se deslicen por el tapete sanitario para prevenir la diseminación del organismo entre los perros aislados sospechosos como con perros de nuevo ingreso y libres de *B. canis* (Ramírez, 1978).

- Determinar la fuente de transmisión así como la supresión inmediata de ésta (Johnson y Walker, 1992).
- Vigilar que el personal que esté a cargo del cuidado de los animales presente buena higiene ya que la brucelosis canina es un problema de salud pública (Johnson y Walker, 1992). Se procederá a establecer desinfección de las manos con los compuestos antes mencionados (Carmichael, 1978).
- Llevar a cabo un programa efectivo para prevenir brotes futuros, una vez que se haya erradicado la enfermedad (Johnson y Walker, 1992).

La prevención de la infección y la eliminación de los perros infectados debe ser la principal estrategia de control en los criaderos. Deben permitirse por lo menos de 3 semanas para hacer nuevas pruebas para asegurarse de que un resultado seropositivo indica una infección verdadera ó un resultado falso positivo. Dos pruebas serológicas con 4 - 6 semanas de intervalo deben requerirse a todos los perros antes de introducirlos a una colonia de reproducción y mantenerlos separados. Las dos pruebas detectaran a perros que puede estar incubando la enfermedad. Si una hembra aborta, deberá asumirse infección hasta que sea probado lo contrario. Las hembras que abortan deben ser mantenidas aisladas y las perreras deben ser desinfectadas. Si el macho pierde interés en la monta ó desarrolla anomalías testiculares ó pobre fertilidad, debería ser examinado para brucelosis (Shin y Carmichael, 1999).

Las pruebas diagnósticas y la eliminación de los perros infectados son los únicos métodos probados de erradicación de la *B. canis* en un criadero infectado. Se debe intentar identificar la fuente de infección; desafortunadamente, esto raramente se ha logrado ya que los criadores son reticentes a admitir su culpabilidad.

El manejo de los perros y criaderos infectados es costoso y toma mucho tiempo. Los veterinarios deben estar preparados para responder a las preocupaciones de los propietarios y para dar consejos juiciosos, los cuales podrían variar de acuerdo a las circunstancias. La prevención es esencial para evitar el cuadro de infección en un criadero. Tan pronto como la brucelosis canina se diagnostique en un criadero, se deben implementar medidas rigurosas hasta que la enfermedad sea erradicada. Los criaderos infectados deben entrar en cuarentena, aunque no hay regulaciones formales en muchos estados y países. La falta de tales medidas ha llevado a una diseminación; incluso internacional, de la infección por *B. canis* (Shin y Carmichael, 1999).

Cuando la brucelosis canina afecta a perros no comerciales (con propietario) se le indicará al dueño que será necesario realizar la eutanasia al can, ya que se puede correr el riesgo de que los propietarios puedan padecer la enfermedad, o bien indicarles que el tratamiento es por periodos prolongados y aparentemente de costo elevado. Si el paciente es sometido a tratamiento, es fundamental realizar la orquiectomía en el caso de ser machos, esto evitará la diseminación de *B. canis* en la casa, los perros generalmente se recuperan quedando inmunes a reinfección por cierto periodo (Shin y Carmichael, 1999) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Estrategias de control para la brucelosis canina.

Estrategias de control	
<i>Perros de criadero</i>	<i>Mascotas (elecciones difíciles)</i>
<u>Perros positivos: Eutanasia.</u> Aislar a los perros lo más posible.	<u>Aislar</u> a los perros
<u>Pruebas serológicas a todos los perros:</u> Aglut/AGID (hemocultivos a animales sospechosos)	<u>Castración más tratamiento</u>
<u>Pruebas diagnosticas mensuales durante 3 meses</u> hasta que la colonia sea negativa en 2 pruebas sucesivas.	Tratamiento incierto; mayores probabilidades de éxito en las infecciones tempranas. Seguimiento serológico por 3 meses post-tratamiento <u>Considerar Eutanasia:</u> tratamiento incierto; costo elevado; frecuente decepción.

Fuente: Shin y Carmichael, 1999.

13. Implicancia en salud pública – la enfermedad en el hombre

La brucelosis es una de las principales zoonosis que afecta al humano y es causado por bacteria del género *Brucella*, siendo las especies lisas las más patógenas. Existen publicaciones que describen la infección por *B. canis* en el hombre (Swenson *et al.*, 1972; The Center for food security & Public Health, 2007b); sin embargo, es escasa la información referente al verdadero significado de la enfermedad desde el punto de vista de Salud Pública. Aún así, el hombre es susceptible a la infección por *B. canis* aunque en menor grado que en las brucelas clásicas (Vásquez y Miranda, 1995). Es por ello que los propietarios de perros con este organismo, que no deseen realizar la eutanasia al can como método de control, deberán estar informados sobre el riesgo que existe al tener un animal infectado dentro de la casa-habitación. (Carmichael, 1976)

El primer caso de brucelosis en el hombre fue descrito en Estados Unidos en el año 1967 (Borie y Pinochet, 1987); a partir de esa fecha se han notificado aproximadamente 40 casos de infecciones humanas reportadas en varios países, sin embargo el número actual es desconocido dado que los casos rara vez son diagnosticados o reportados. (Shin y Carmichael, 1999)

Ahora tenemos que la predilección de las familias por incorporar perros en sus viviendas es ya una costumbre, cuya consecuencia más directa ha sido la creación de un fuerte lazo afectivo con dichos animales. Así, la convivencia es cada vez más estrecha, especialmente en los niños, quienes ven a sus mascotas como compañeros inseparables. Esta costumbre hace que los riesgos de infección sean cada vez mayores.

A pesar de que la enfermedad no es sólo de riesgo profesional, es importante que el clínico menor adopte todas las medidas de protección cuando examine un paciente sospechoso. (Borie y Pinochet, 1987)

Para esto es importante emplear procedimientos de bioseguridad en la manipulación y colección de materiales sospechosos de infección por *B. canis*, pues la brucelosis canina es una zoonosis de transmisión por aerosoles, ingestión y contacto con mucosas o soluciones de continuidad. De esta forma, se debe utilizar siempre materiales de protección individual, como guantes, mascarillas, gorro y mandiles, para protegerse de la infección. Los equipos utilizados en la recolección o en los restos de tejidos contaminados deben ser desinfectados (hipoclorito de sodio a 2,5% por una hora, formol al 5% por una hora, cal a 15%) y descartados correctamente (autoclavado, incineración, entierros en locales apropiados). Como esta clasificado como patógeno de nivel de bioseguridad 3, el aislamiento de *B. canis* tienen que ser realizado en laboratorios que cuenten con instalaciones para trabajo en nivel de Bioseguridad 3. Por esto solo pocos laboratorios tienen condiciones de aislar *B. canis*. En general esos laboratorios están ligados a instituciones de investigación o universidades (Minharro, 2005).

La forma de transmisión canino-humano posiblemente es el contacto directo, exposición a tejidos infectados (aborto, secreciones vaginales) y orina. Para que el hombre pueda adquirir la infección se necesitan gran cantidad de organismos. Se debe considerar que existen pocos reportes de brucelosis causada por esta especie al humano, sin embargo, no deja de ser una zoonosis importante cuyo diagnostico de laboratorio a nivel nacional esta limitado (The Center for food Security & Public Health, 2007b).

El cuadro clínico que presenta el humano infectado por *B. canis* es la presentación de fiebre intermitente de 40 C°, escalofrío, dolor corporal, malestar general, sudoración, pérdida de peso, tos, cefalea, náuseas, fatiga, dolor articular, linfadenitis posterior cervical, epitroclear y axilar, diarrea esplenomegalia, mialgia, en ocasiones, el paciente infectado puede ser asintomático (The Center for Food and Public Health, 2007b). Es importante destacar que, en el ser humano no se

ve comprometido el tracto reproductivo (abortos, infertilidad, etc.) y, que el curso de la enfermedad es más leve que el producido por las otras especies de brucelas. Las complicaciones incluyen endocarditis, miocarditis, pericarditis, meningitis, artritis, hepatitis y abscesos viscerales (Carmichael y Greene, 1998; Hartigan, 1997) Además, se han descrito casos complicados que presentan múltiples manifestaciones clínicas, entre ellas, digestivos, musculares, neurológicos, articulares y respiratorias (Borie y Sánchez, 2002).

El diagnóstico de confirmación es a través de pruebas serológicas y aislamiento, si presenta títulos de aglutinación superiores a 1:200 se toma como positivo (Carmichael, 1978; Swenson *et al.*, 1972).

La brucelosis aguda en el hombre responde rápidamente al tratamiento prolongado con drogas. Según la Organización Mundial de la Salud, en adultos se utiliza rifampicina y doxiciclina por un mínimo de 6 semanas; en niños con enfermedad no complicada, la rifampicina es de elección, con cotrimoxazol o quinolonas como alternativa o en terapia combinada (Borie y Sánchez, 2002).

La terapia antibiótica se realiza con tetraciclina, estreptomina y ampicilina (Carmichael, 1978). Se administro a una paciente con infección de *B. canis* ampicilina 8 g/día, en combinación con estreptomina 1g/día intramuscular durante 4 semanas, al parecer en este transcurso la paciente se recupero presentando resultados de cultivo negativo (Swenson *et al.*, 1972). Al contrario que en el perro, las personas infectadas responden rápidamente al tratamiento con antibiótico (tetraciclinas ó tetraciclinas más estreptomina) (Shin y Carmichael, 1999).

14. Repercusión económica

La brucelosis causa grandes pérdidas por conceptos de abortos, problemas reproductivos e interrupción de líneas genéticas. Las pérdidas que causa la enfermedad se clasifica de la siguiente manera:

- a) **Pérdidas directas o aparentes:** Comprenden principalmente la pérdida de las crías ya sea por los abortos y o por muerte neonatal, así como los problemas reproductivos, es decir, la infertilidad que provoca *B. canis*, y demás gastos de asistencia veterinaria.
- b) **Pérdidas directas no aparentes:** Contemplan la depreciación de animales enfermos, retrasan el crecimiento, perdida de líneas genéticas y por consiguiente perdida en el mercado interno.
- c) **Pérdidas indirectas o consecutivas:** Repercuten sobre la salud humana y a los gastos de enfermedad que sean producidos (Ciprian, 1978).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en el distrito de Pucusana (kilómetros 58 a 68 de la Panamericana Sur), la cual tiene una superficie aproximada de 46 km², con una población estimada de 10, 633 habitantes (Anexo 1). El criterio de selección del área se basó en las características epidemiológicas tomando los índices de NBI (necesidades básicas insatisfechas) del año 2005 con un promedio de 47% que expresan la carencia de condiciones básicas de higiene, gran cantidad de caninos vagabundos en contacto con humanos y la posibilidad de acceso al lugar.

En la zona hay casas tomadas e inquilinatos habitados por numerosas familias con perros y gatos ocupando el mismo espacio físico, que se caracteriza por la falta de higiene, también hay jaurías de perros sin dueño que deambulan libremente diseminando sus deyecciones.

Como límites se tiene:

Por el Norte: Distrito Santa María del Mar

Por el Sur: Distrito de Chilca

Por el Este: Provincia de Cañete

Por el Oeste: Océano Pacífico

Se tomaron muestras sanguíneas de caninos que acudieron en forma masiva a 3 campañas de salud que se realizaron en la Plaza de Armas y por el modo de visitas a domicilio, recorriendo los diferentes sectores de este distrito entre los meses de julio, agosto y setiembre del 2009.

2. ANIMALES Y OBTENCION DE INFORMACIÓN

Se reclutaron caninos machos y hembras de diferentes razas que acepten los siguientes criterios de inclusión: mayor de 6 meses de edad, que tuvieran dueño que den el consentimiento para realizar el estudio en la mascota; y que tuvieran sospecha de ambulación. Para contar con la participación de los dueños, permitiendo tomar muestras de sangre de sus mascotas, se optó por dar tratamiento antiparasitario y consultas gratuitas si así lo deseara el dueño. Se

confeccionó y aplicó un cuestionario (Anexo 2), en donde se registraron los siguientes datos: identificación del animal, raza, sexo, edad, paseos en exteriores, enfermedades previas e historial reproductivo: apareamientos, preñez, problemas reproductivos.

A los dueños también se les preguntó su conocimiento acerca de la brucelosis canina tomando en cuenta puntos como: el agente causal, forma de transmisión, lesiones, así como su importancia en salud pública.

3. MUESTREO

Las muestras sanguíneas se obtuvieron por venopunción (cefálica o safena). Cada muestra fue identificada inmediatamente después de la toma de muestra, y se colocaron en una gradilla a la espera de la retracción del coágulo. Se depositaron en un cooler con gel refrigerante y fueron transportados al Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la U.N.M.S.M en Lima. Se obtuvieron los sueros mediante centrifugación y se transfirieron a viales de 2ml para luego ser congelados hasta el procesamiento respectivo.

4. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales de muestreo:

- ❖ 01 mandil.
- ❖ 01 maletín de trabajo.
- ❖ 01 termo cooler.
- ❖ 02 gradillas
- ❖ 500 tubos de ensayo estériles.
- ❖ 1000 agujas hipodérmicas 21G x 1” descartables.
- ❖ 500 gr. de algodón.
- ❖ Alcohol.
- ❖ Agua oxigenada.
- ❖ Tintura de yodo.
- ❖ 01 caja de guantes.
- ❖ 50 hojas de afeitar.
- ❖ 01 pinza hemostática.
- ❖ 02 bozales.
- ❖ 5 paquetes de gasa.
- ❖ 03 esparadrapos.
- ❖ 02 jabones antibacterianos.
- ❖ 250 hojas de encuesta.

Materiales de laboratorio:

- ❖ 500 tips de 2.5 ml.
- ❖ 02 micropipetas.
- ❖ 01 cronómetro.
- ❖ 04 gradillas.
- ❖ 50 placas petri

Equipos:

- ❖ 01 centrifuga
- ❖ 01 congelador
- ❖ 01 refrigeradora.
- ❖ 01 Baño María.

Reactivos:

- ❖ Sueros problema.
- ❖ Control positivo.
- ❖ Control negativo.
- ❖ Antígeno de *Brucella ovis* para IDGA (INTA, Argentina).

5. TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño mínimo de muestra poblacional (n=202) fue obtenido aplicando el método de cálculo del tamaño de la muestra para estimar una proporción (Martin, 1997), tomándose como referencia una prevalencia de 15.57%, según trabajos previos (Ramírez, 2005), y un nivel de confianza del 95%.

$$n = \frac{z^2 p(1-p)}{e^2}$$

Donde:

- n = tamaño muestral
- z = 1.96 (95% de confianza)
- p = prevalencia = 0.1557
- e = 0.05 (nivel de precisión)

Reemplazando:

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.1557(0.8443)}{0.05^2} = 202 \text{ animales}$$

6. PRUEBA UTILIZADA

Se utilizó la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA), que consiste en una reacción de precipitación en fase líquida entre el antígeno y el anticuerpo, formando bandas visibles de precipitación (Tizard, 1998). Esta técnica tiene la ventaja de emplear un antígeno de *B. ovis* que contiene un lipopolisacárido rugoso, específico para brucelas rugosas (como *B. canis*) y que no presenta reacciones cruzadas con otras especies de brucela en su forma lisa (Véliz et al., 1974). La IDGA es una prueba cualitativa, por lo que se consideran positivos los sueros que reaccionan con el antígeno formando la banda de precipitación dentro de 24 a 48 horas y negativos los sueros que no forman bandas de precipitación.

6.1 Preparación Gel de Agar

A. Solución Tope de Sorensen (pH 7.2-7.3)

Na₂HPO₄ (anhidro)

8.0 g

KH ₂ PO ₄ (anhidro)	1.1. g
H ₂ O destilada c.s.p	1000 ml

B. Solución salina al 5% con Tope de fosfatos (pH 7.2)

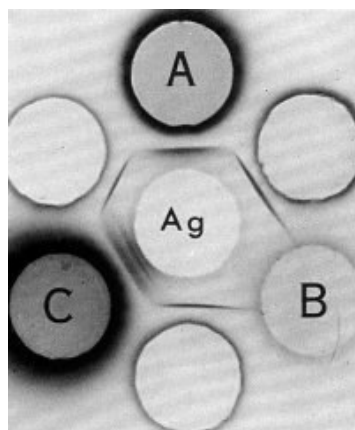
Solución de cloruro de sodio al 5%	1840 ml
Solución Tope de Sorensen (A)	160 ml

C. Agar Blando Para La Prueba De Inmunodifusión En Gel

Agar agar	1.0 g
Solución salina al 5% con Tope de fosfatos (B)	100 ml
Merthiolate	1:10000

6.2 Técnica de la prueba de IDGA

- Disolver el agar gel con agitación al baño maría hasta que la solución se haga homogénea y transparente.
- Fundir y preparar geles de 3-4 mm de espesor sobre placas petri grandes.
- Dejar gelificar y conservar en cámara húmeda a 4°C.
- Hacer pocillos con disposición de roseta: 1 pocillo central y 6 en la circunferencia. (Figuras 6 y 7)
- Colocar el antígeno en el pocillo central y 3 sueros problemas intercalados con 3 controles positivos (sueros de animales que son positivos a B. canis) en los pocillos periféricos. La cantidad de volumen a aplicar es de 23ul en cada pocillo.
- Se deja incubar durante 48 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- La lectura se realizó pasadas las 24 horas. La prueba de AGID es de tipo cualitativa, considerándose positivo a todo suero que reacciona con el antígeno, es decir, la observación de la banda de precipitación; y negativo a los que no forman esta banda.



Figuras 6 y 7. Realización prueba IDGA.

7. ANÁLISIS DE DATOS

7.1 Prevalencia

Se determinó la seroprevalencia de *B. canis* en el distrito de Pucusana con la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\text{número de animales positivos}}{\text{total de animales}} \times 100$$

7.2 Intervalo de confianza

La tasa de prevalencia fue expresada con intervalos de confianza (IC) al 95% según la siguiente fórmula:

$$I.C = p \pm z \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

En donde:

p = prevalencia
z = 95% de nivel de confianza
q = 1-p
n = tamaño muestral

7.3 Análisis de Variables

Se evaluó la asociación de las variables sexo, edad raza, e historia reproductiva (abortos) con la positividad a la prueba (IDGA), mediante la prueba de Ji-cuadrado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Perú no hay datos sobre la enfermedad en perros con hábitos de vagabundeo y peridomiciliarios en zonas carentes de condiciones básicas de higiene. Teniendo en cuenta que podría ser de importancia en el contagio de la enfermedad al hombre, el objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de brucelosis canina en perros en el distrito de Pucusana donde existe un alto índice de necesidades básicas insatisfechas (NBI).

De los 202 perros muestreados en la presente tesis, se encontró que 43 de éstos fueron positivos a la prueba de Inmunodifusión el gel de agar (IDGA). Con esto la prevalencia de brucelosis canina en los perros del distrito de Pucusana fue de $21.28\% \pm 2.88\%$ (43/202). Este porcentaje de positivos es mayor al que encontró Ramírez (2005) en los distritos de Bellavista y Callao, utilizando la misma prueba y con un resultado de 15.57% de perros positivos.

En la tabla 1, se observa la distribución de los animales muestreados y los que dieron positivo a la prueba, procedentes de la Campaña de Salud 1, 2 y 3, y las que se realizaron puerta por puerta (visitas domiciliarias). El mayor porcentaje de perros positivos se encontró en la 1era. Campaña de salud y el menor porcentaje se encontró en la 3era. Campaña de salud.

Tabla 1. Procedencia y número total de animales muestreados en el distrito de Pucusana

En la tabla 2, se observa que el porcentaje de positivos en perros machos es de 16.80%

Procedencia	Total de animales	Positivos	
		Nº	P + IC 95%
Campaña de salud Nº 1	40	14	35.00% ± 7.54%
Campaña de salud Nº 2	37	6	16.22% ± 6.06%
Campaña de salud Nº 3	33	1	3.03% ± 2.98%
Visitas domiciliarias 1	18	1	5.55% ± 5.40%
Visitas domiciliarias 2	13	2	15.38% ± 10.00%
Visitas domiciliarias 3	21	5	23.81% ± 9.29 %
Visitas domiciliarias 4	20	9	45.00% ± 9.68%
Visitas domiciliarias 5	20	5	25.00% ± 9.68%
TOTAL	202	43	21.28% ± 2.88%

± 3.34% (21/125) y en las hembras es de 28.57% ± 5.14% (22/77); encontrándose diferencia estadística significativa entre los porcentajes de positivos por sexo. Ya que se sabe que no existe predisposición por sexo para infectarse con *B. canis* (Carmichel, 1976; Carmichael y Joubert, 1988; Carmichael y Shin, 1999), se explica que exista diferencia estadística significativa porque en el estudio la mayor cantidad de animales fueron machos (125) versus las hembras que fueron 77. Así tenemos un estudio realizado en el Centro de Bienestar Animal “La Perla” en Medellín, Colombia en el año 2008 donde se muestrearon 221 caninos y se realizó prueba de aglutinación rápida en placa. Se encontró una seroprevalencia del 6.78%, y no hubo diferencia por grupos de edad o sexo.

Tabla 2. Distribución de animales muestreados por sexo y su resultado en la prueba de IDGA.

Sexo	Total	Positivos	
		Nº	P + IC 95%
Macho	125	21	16.80% ± 3.34%
Hembra	77	22	28.57% ± 5.14%
TOTAL	202	43	21.28% ± 2.88%

En la tabla 3, se observa el número total de perros muestreados considerando si eran de raza Peruano sin pelo (es la raza más popular en este distrito); de otra raza o si eran mestizos, encontrándose entre los perros peruanos sin pelo un porcentaje de positivos de 9.09% ± 6.12% (2/22), entre los perros de raza (no peruano sin pelo) se encontró que el porcentaje de positivos fue de 19.5% ± 5.84% (9/46) y entre los perros mestizos fue de 23.88% ± 3.68 (32/134). No se encontró diferencia significativa entre los porcentajes de positivos en la variable raza. Esto es porque aunque los primeros casos descritos fueron en la raza beagle, luego se detectó infección en otras razas como weimaraners, foxhounds, bobtails, pointers, greyhound, schnnauzers, actualmente no existe evidencias de que hay susceptibilidad para infectarse con *B. canis* (Carmichael y Shin, 1999; Boeri *et al.*, 2008).

Lo que si no debemos excluir es que los perros criados con fines comerciales (criaderos), tienen mayor riesgo de infectarse por *B. canis*. Esto es por la alta actividad reproductiva que existe, el

contacto bastante estrecho que existe entre animales y por el ingreso de nuevos ejemplares sin pasar por pruebas serológicas para esta enfermedad. (Johnson y Walker, 1992)

Tabla 3. Distribución de los animales por raza positivos a la prueba de IDGA

Raza	Total de animales	Positivos	
		N ^o	P + IC
<i>Peruano sin pelo</i>	22	2	9.09 % ± 6.12%
<i>Otra raza</i>	46	9	19.56% ± 5.84%
<i>Cruzado</i>	134	32	23.88% ± 3.68%
TOTAL	202	43	21.28% ± 2.88%

En la tabla 4, se muestra el número de animales que tienen o no antecedentes reproductivos. En este punto se consideró si el macho ya tenía cruces previas, con qué frecuencia y si había preñado a alguna perra. En cuanto a las hembras se consideró también si había sido cruzada, las veces que quedó preñada, si tuvo abortos o mortalidad perinatal. No se encontró diferencia estadística significativa entre el porcentaje de positivos de los perros que tenían un historial reproductivo, $25.24\% \pm 4.28\%$ (26/103) de los que no, $17.18\% \pm 4.71\%$ (11/64). De los otros 35 perros faltantes del total de 202, sus dueños no sabían si se habían apareado sus mascotas. Lo que resalta en el presente estudio es que se encontraron más perros positivos a la prueba con antecedentes reproductivos que los que no, todo lo contrario a lo que se encontró en la tesis de Ramírez (2005).

Tabla4. Distribución de los animales por su historial reproductivo y su positividad a la prueba de IDGA

Historial reproductivo (HR)	Total	Positivos	
		Número	P \pm IC
Con HR	103	26	$25.24\% \pm 4.28\%$
Sin HR	64	11	$17.18\% \pm 4.71\%$
No sabe	35	6	$17.14\% \pm 6.37\%$
TOTAL	202	43	$21.28\% \pm 2.88\%$

En la tabla 5 tenemos a los animales distribuidos por sus hábitos domiciliarios (solo salen a la calle con el dueño) o peri-domiciliarios (tienen dueño, pasan toda la mañana en la calle y luego en la noche entran para comer y descansar). No se observó diferencia estadística significativa igual que un estudio realizado en Buenos Aires, Argentina entre los años 2005 y 2006 en donde también tomaron muestras de perros vagabundos a diferencia del presente trabajo (Boeri *et al*, 2008). Tal vez esto se dé porque aun así el simple de hecho de salir a pasear con su dueño por un breve momento lo expone al contagio, ya que se sabe que la orina de los machos es fuente de transmisión, aparte de los otros elementos como secreciones vaginales y restos de placenta, etc.

Tabla 5. Distribución de los animales por sus hábitos de salida a la calle y su positividad a la prueba de IDGA

Hábitos de salida a la calle	Total	Positivos	
		Número	P ± IC
domiciliarios	102	20	19.67% ± 3.93%
Peri-domiciliarios	100	23	23.00% ± 4.20%
TOTAL	202	43	21.28% ± 2.88%

Se debe mencionar que a ninguna de las mascotas muestreadas se le practicó anteriormente la prueba de IDGA para encontrar anticuerpos contra *Brucella canis*. Además durante la encuesta ninguno de los dueños conocía de la enfermedad, lo que denota el desconocimiento por parte de ellos sobre esta enfermedad y lo más importante: su carácter zoonótico.

Es importante recalcar el deber del médico veterinario en hacer conocer a los dueños los riesgos que significa mantener un animal infectado dentro del hogar. Así mismo, los médicos veterinarios de la especialidad de clínica menor deben promover entre los propietarios de perros, sean criadores o particulares, la puesta en práctica de medidas para prevenir, disminuir o eliminar el problema.

Todos los animales destinados a reproducción deben estar libres de la enfermedad para evitar su diseminación y todas las sospechas de brucelosis canina deben ser confirmadas para que se pueda controlar esta enfermedad.

El diagnóstico de la infección por *B. canis* es fundamental para que el control y la manutención del animal o canil libre de enfermedad ocurra. Entretanto, la brucelosis canina no es frecuentemente diagnosticada a causa de las dificultades encontradas en su diagnóstico.

Dada la importancia que representan los animales infectados en la diseminación de la enfermedad, es recomendable el empleo de por los menos 2 procedimientos serológicos antes de llegar a un diagnóstico definitivo. Los resultados del IDGA deben considerarse exclusivamente como presuntivos. En todos los casos se recomienda practicar hemocultivos y siempre que haya abortos se debe intentar el aislamiento a partir de los productos abortados.

Tabla 6. Asociación de las variables raza, edad, historia reproductiva (abortos) y sexo con la positividad a la prueba (IDGA), mediante la prueba de Ji-cuadrado (p<0.05)

VARIABLES	Prueba (IDGA)		p	
	Positivo	Negativo		
Raza	Cruzado	32	102	0.276
	Peruano sin pelo	2	20	
	Otras razas	9	37	
Edad	6m a 1año	16	58	0.992
	>1año a 5años	19	72	
	>5años	8	29	
Aborto	No abortó	16	46	0.245

	Aborto	5	5	
	Se desconoce	1	1	
Sexo	Macho	21	104	0.047
	Hembra	22	55	

La tabla 6 muestra los valores de p calculado para la prueba de Ji- cuadrado. Para el presente estudio solo se evidenció asociación entre el sexo de los animales y el resultado de la prueba IDGA ($p < 0.05$). Para las variables raza, edad y aborto se evidenció que no existe asociación con el resultado de la prueba IDGA, lo que se corrobora con lo que se conoce de *B. canis*, la cual afecta a perros sin importar la raza ni edad. Es posible que los abortos registrados sean debidos a causas que no se consideraron en el presente estudio.

V. CONCLUSIONES

Utilizándose la prueba de Inmunodifusión el gel de Agar (IDGA), se encontró una prevalencia de $21.28\% \pm 2.88\%$ (43/202), en el distrito de Pucusana. Es un alto porcentaje de perros serológicamente positivos a *B. canis* detectado en un área de bajos recursos.

De las variables que se consideraron en el presente estudio, sólo se encontró asociación estadística significativa en la correspondiente a sexo; esto se explica porque en el estudio la mayor cantidad de animales fueron machos en comparación de las hembras.

El resultado nos muestra el alto riesgo en el que se encuentra la salud de la población expuesta, por lo cual este tipo de estudio debería ser ampliado a la población humana para dar base científica a la sospecha clínica de esta enfermedad.

Los datos de prevalencia descritos en el presente estudio muestran la necesidad de prestar mayor interés a la brucelosis causada por *B. canis*, la cual podría representar un verdadero

problema desde el punto de vista de zoonosis, especialmente si se considera que el número de perros callejeros en este distrito alcanza proporciones alarmantes.

Estos resultados y los de otros autores orientan a la necesidad de implementar programas de control de los perros vagabundos, y el desarrollo de programas de educación sanitaria con énfasis en la tenencia responsable para limitar el potencial zoonótico de esta enfermedad.

VI. LITERATURA CITADA

1. American Society for Microbiology. Manual of clinical microbiology. 5 ed. 1991.
2. Alton GG, Jones LM, Pietz L. 1975. Laboratory techniques in brucellosis. 2nd. Ed., World Health Organization, Geneva. 149p.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1988. Serological methods. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France. p 157-167.
4. Ardoino SM, Baruta DA, Tso RE. 2006. Ciencia Veterinaria 8 (1):49-60. Argentina. ISSN: 1515-1883.
Disponible en:
[Http://www.vet.unlpam.edu.ar/~matervet/revistanro8/Brucelosis_canina.pdf](http://www.vet.unlpam.edu.ar/~matervet/revistanro8/Brucelosis_canina.pdf).
Revisado 27 enero 2011
5. Baker DD. 1971. Canine brucellosis. Cornell Research Lab for Diseases of Dogs 2: 1- 4.
6. Berthelot X, Garin BB. 1993. Brucelloses canines. Point Vet 25: 125-129.
7. Blank O, Retamal P, Abalos P, Torres D. 2002. Detección de anticuerpos anti-brucella en focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) de Cabo Shirref, Antártica. Arch. Med. Vet. 34(1):117-122.
8. Blasco J, Gamazo C. 1994. Brucelosis animal. Investigación y ciencia 218:56-62.

9. Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa –Estani S, Lucero NE. 2008. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. Rev. Medicina (Buenos Aires) 68:291-297. ISSN 0025-7680.
Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v68n4/v68n4a04.pdf>.
Revisado 27 enero 2011
10. Boffil P, Rivas A, Ramirez W, Montañez J, Martinez A, Quincoses T, González LR, Fustes E. 1989. Manual de Enfermedades Infecciosas. Tomo I. Ed. I.S.A.C.H., M.E.S.
11. Borie C, Pinochet V. 1987. Brucelosis canina: conceptos generales y estudios realizados en el país. Monografías de Medicina Veterinaria, vol. 9(2), diciembre. Depto. de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.
12. Borie C, Sánchez CM. 2002. Brucelosis en el perro. Tecno Vet Año 8 N°1, marzo.
13. Borie C, Cepeda R, Villaroel M. 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. Arch. med. vet. 34(1): 111-116 ISSN 0301-732X.
Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000100012&lng=es&nrm=iso. ISSN 0301-732X.
14. Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz, M, O’Callaghan D. 2002. The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 99:1544-1549.
15. Bowden RA, Cloeckert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G. 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infect. Immun. 63:3945-3956.
16. Briseño GH. 1990. Problemas reproductivos asociados a *Brucella canis* en perros machos. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med Vet y Zoot UNAM. México DF.
17. Carmichael LE. 1966. Abortion in 200 beagles. JAVMA, v. 149 n° 8, 1126 p.
18. Carmichael LE. 1967. Contagious abortion in beagles. Hounds and Hunting (USA), 64: 14-18.
19. Carmichael LE. 1968. Canine brucellosis: isolation, diagnosis, transmission. Proc US Livestock San Assc. 71: 517-527.

20. Carmichael LE. 1976. Canine brucellosis: current status. Cornell Research Lab for Diseases of Dogs. 2: 1-6.
21. Carmichael LE. 1978. Brucellosis caused by *Brucella canis*. En: Steels JH. (Ed) series in zoonoses. Ed. CRC Hand book, Florida, USA. p 185-194.
22. Carmichael LE. 1990. *Brucella canis*. En: Animal Brucellosis. Nielsen KH and Duncan J R. Ed. CRC Press Boca Raton, Florida, USA. p 336-350.
23. Carmichael LE. 1996. Canine brucellosis: A diagnostician's dilemma. En: Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals) 11:161-165.
24. Carmichael LE. 1998. Brucelosis canina causada por *B. canis*: enfermedad clínica: problemas en inmunodiagnóstico. Revista de Medicina Veterinaria. 80(2): 102-106.
25. Carmichael LE, Bruner DM. 1968. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. Cornell Vet. 48(4): 579-592.
26. Carmichael LE, Kenney R. 1970. Canine Brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. JAVMA. Vol. 156. N° 12. Junio.
27. 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.
28. Carmichael LE, Joubert JC. 1988. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. Cornell Vet; 78:63-73.
29. Carmichael LE, Joubert JC, Jones L. 1989. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. Vet Microbiol. 19:373-387.
30. Carmichael LE., Greene CE. 1993. Brucelosis canina. En: Enfermedades infecciosas de los perros y los gatos. Interamericana McGraw-Hill. p 604-616.
31. Carmichael LE, Shin SJ. 1996. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. Semin. Vet. Med. Surg. (small animal) 11: 161-165
32. Carmichael LE, Greene CE. 1998. Canine brucellosis. En: Greene, CE. Infectious disease of the dog and cat. Philadelphia: W.B. Saunders. p 248-257.
33. Castro HA, Gonzalez SR, Prat MI. 2005. Brucellosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 39 (2): 203-16.
34. [CDC] Center for Diseases Control and Prevention. 1978. Brucellosis caused by *Brucella canis* (United States Veterinary Public Health Notes, october, USA).

35. Ciprian CA. 1978. Repercusión económica de la brucelosis en México. Memorias del Foro Nacional sobre brucelosis. SARH INIP ENEP-C: 76-78.
36. Cloeckert A, Tibor A, Zygmunt MS. 1999. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6(4):627-629.
37. Coll J. 1993. Técnicas de diagnóstico en virología. Ed. Díaz de Santos. 1era. Ed. México. 336 p.
38. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. 2001. Essential role of the *virB* machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. Cell Microbiol. 3:159-168.
39. Corbel MJ. 1997. Brucellosis: an overview. Emer. Infect. Dis. 3: 213-221.
40. Corro SE. 1994. Compendio de bacteriología veterinaria y su importancia en Salud Pública. Tesis de licenciatura. Fac. de Est. Sup.. Cuautitlán. UNAM. Edo. De México.
41. Crespo León, F. 1994. Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties. París, Francia. ISBN 92-9044-342-1.
42. Dawkins BG, Machotka SV, Suchmann D. 1982. Pyogranulomatous dermatitis associated with *Brucella canis* infection in a dog. JAVMA 181: 1432-1433.
43. De los Reyes M. 2000. Andrología canina. En: De los Reyes M, Sánchez A. (eds). Tópicos en Reproducción de pequeños animales. Santiago, p 82-93.
44. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. 1990. Entry and intracellular localization of *Brucella sp.* in vero cells: fluorescence and electron microscopy. Vet. Pathol. 27:317-328.
45. Dillon AR, Henderson RA. 1981. *Brucella canis* in a uterine stump absceso in a bitch. JAVMA 178: 987-988.
46. El Bahri L, Ben Osamn F, Chadli A. 1970. Serological survey for canine brucellosis in Tunis. Arch. Pasteur. Inst. (Tunis): 315-331.
47. Englehardt C. 1974. Incidencia de *Brucella canis* en perros en el Distrito de Chiclayo. Tesis. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Perú.
48. Ewalt D, Payeur J, Martin B, Cummins D, Miller G. 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*T. truncatus*). J. Vet. Diagn. Invest. 6:448-452.

49. Fenner WR. 1994. Medicina Veterinaria de perros y gatos. Ed. Limusa. México D.F. 599 p.
50. Flanders JA, Schlafer DH, Yeager AE. 2000. Diseases of the canine testes. En: Kirk'S Current Veterinary Therapy XIII Small Animal Practice (Bonagura, J. D. Ed.), WB. Saunders Company, p. 941-945.
51. Flores CR, Carmichael LE. 1975. Patogenicidad y propiedades antigénicas e inmunogénicas de la cepa variante M- de *Brucella canis*. En: XII Reunión anual Inst. Nac. de Investigaciones pecuarias. SAG. México.
52. Flores CR, Carmichael LE. 1978. Canine brucellosis. Current status of methods for diagnosis. Cornell Vet., 68: 76-88.
53. Flores CR, Carmichael LE. 1981. *Brucella canis* infection in dog: treatment trials. Rev Lat Amer Microbiol. 23: 75-79.
54. Flores CR, Carmichael LE. 1986. Caracterización de diferentes cepas de *Brucella canis*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 28:145-151.
55. Flores CR, Segura R. 1975. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in México. Cornell Vet. 66:347-352.
56. Flores CR. 1978. Canine brucellosis: analysis of method for diagnosis and treatment. Thesis, Cornell University, Ithaca, N.Y.
57. Freer E, Castro-Arce R. 2001. Brucella: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. Rev. costarric. cienc. méd, jun., vol.22, no.1-2, p.73-82. ISSN 0253-2948.
58. García-Carrillo C. 1987. La brucellosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Office International de Epizooties. París, Francia.
59. George LW, Carmichael LE. 1984. Antisperm response in male dog with chronic *Brucella canis* infection. Am. J. Vet. Res. 45: 274-281.
60. George LW, Duncan RJ, Carmichael LE. 1979. Semen examination in dogs with canine brucellosis. Am. J. Vet. Res. 40: 1589-1595.
61. Gomez JM, Villalba EJ, Pasamontes B, Díaz EJ, Gasca A. 1990. Utilización de la técnica de ELISA para detectar anticuerpos frente a *Brucella canis* en sueros caninos. Med Vet; 7: 531-534.
62. Gorvel JP, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 90:281-297.

63. Gwin RM, Kolwalski JJ, Wyman M, Winston S. 1980. Ocular lesions associated with *Brucella canis* infection in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*; 16: 607-610.
64. Hartigan PJ. 1997. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Veterinary Journal* 50(3): 179-180.
65. Henderson RA, Hoerlein BF, Kramer TT, Meyer ME. 1974. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. *JAVMA* 165:451-455.
66. Hill W, Van-Hoosier G, McCormick N. 1970. Epizootic abortion in a canine production Colony. *Lab. Anim. Care* 20:205-208
67. Hoff G, Schneider N. 1975. Serologic survey of agglutinins to *Brucella canis* in Florida residents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:157-159.
68. Hoff GL, Bigler WJ, Trainer DO, Debbie JG, Brown GM, Wincler WG, Richards S, Reardon M. 1974. Survey of selected carnivore and opossum serums for agglutinins to *Brucella canis*. *JAVMA* 165:830-831.
69. Hoyer BH, McCullough NB. 1968. Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis* canine abortion organisms, and other *Brucella species*. *J. Bacteriol.* 96: 1783-1790.
70. Hubbert N, Bech-Nielsen S, Barta O. 1980. Canine brucellosis: comparison of clinical manifestations with serologic test results. *JAVMA* 177(2):168-71.
71. Jennings P, Crumrine M, Lewis G, Faris B. 1974. The effect of a two-stage antibiotic regimen on dogs infected with *Brucella canis*. *JAVMA* 164(5): 513-514.
72. Johnson C, Walker R. 1992. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Continuing Education*. Vol.14 N° 6. Junio.
73. Johnston SD, Root-kustritz MV, Olson PN. 2001. Canine pregnancy. En: *Canine and feline theriogenology* . Johnston SD, Root-Kustritz MV, Olson PN. (eds.) W. B. Saunders Co. p. 66- 104.
74. Jones LR, Emerson JK. 1984. Canine brucellosis in a commercial breeding kennel. *JAVMA* 184: 834-836.
75. Jones DE, Joshua JO. 1988. *Reproductive clinical Problems in the Dog*. 2nd Edition, Wright (Butterworth Scientific), London.
76. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O 'Callaghan D, Ramuz M. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol. Microbiol.* 3:99-106.

77. Keid LB. 2001. Diagnostico da brucelose canina por *Brucella canis*. Correlação entre exames clinicos e laboratoriais: imunodifusao em gel de agar, imunodifusao em gel de agar com emprego do 2-mercaptoetanol, cultivo e reação em cadeia pela polimerase. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo. 96 p.
78. Kirk, R. 1997. Terapéutica veterinaria de pequenos animales. XII. Edit. McGraw-Hill Interamericana, México. p 1177-1181, 1347-1352.
79. Lopéz GA. 2007. Estudio de Brucelosis causada por *Brucella ovis* en ovinos y personal en riesgo. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ciencia Animal. Valencia, España.
80. Lucero NE. 1996. *Brucella*. Microbiología biomédica Eds. Basualdo JA, Coto CE, de Torres RA, Atlante, Buenos Aires.
81. Lucero NE. 2004. Diagnostico serológico y bacteriológico de brucelosis humana y canina. Temas de Zoonosis II. Asociación Argentina de Zoonosis. p 159-164.
82. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, López 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.
83. Luna A. 1991. Aislamiento de *Brucella canis* a partir de una perra gestante. Rev. Vet. 2: 7-8.
84. Margaret EM. 1969. *Brucella* organisms isolated from dogs: comparison of characteristics of members of the genus *Brucella*. Am J Vet Res. 30: 1751-1756.
85. Martin M, Mateu EM, García J, Girones O. 1992. Comparación serológica de la brucelosis canina. Med Vet. 9: 703-708.
86. Mateu A, Martin-Castillo M. 1993. Estudios seroepidemiológicos de la brucelosis en perros. Unidad de Patologías Infecciosas y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
87. McMahon KJ. 1983. Comparison of the 2-Mercaptoethanol and (dithio-threitol) tests for determining *Brucella* immunoglobulin G agglutinating antibody in bovine serum. Can. J. Comp. Med. 47(3): 370-372.
88. Michaux-Charachon S, Bourg G., Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D. 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 179(10):3244-3249.

89. Minharro S, Pinto AC, Leite K, Reinato AP, Alves TM, Pereira A. 2005. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte. 29(3-4): 167-173). Disponible en: www.cbra.org.br
90. Miranda AO, Colman RI, Mancebo AO, Monzón CM. 1986. Detección serológica de anticuerpos anti *Brucella canis* en perros y humanos en el oeste de Formosa. Vet. Arg. 3: 158-161.
91. Moore JA. 1969. *Brucella canis* infection in dogs. JAVMA 155: 2034-2037.
92. Moreno E, Moriyón I. 2001. The genus *Brucella*. En: Dwordin M, Falkow S, Resemberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E.(Eds). Ed., The Prokaryotes Springer, New York.
93. Moreno E, Cloeckart A, Moriyón I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. Vet. Microbiol. 90(1-4):209-227.
94. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. J. Bacteriol. 172:3569-3576.
95. Morgan WJ, Corbel MJ. 1975. Recommendations for the description of species and biotypes of the genus *Brucella*. International Symposium on Brucellosis. Rabat.
96. Moriyón I, Díaz R, Lopez-Goñi I. 2001. Bacteriología del género *Brucella*.. In: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. p 21-30.
97. Moriyón I, Gamazo C. 1990. Estructura antigénica de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*. Ovis 8:35-49.
98. Mota E. 1998. Seguimiento de un brote de *Brucella canis* en un criadero de la Ciudad de México. Laboratorio de Análisis Clínicos Veterinarios, CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR. Trabajo presentado en el XIX Congreso Nacional de la AMMVEPE. León, México.
99. Myers DM, Varela-Díaz VM, Coltorti EA. 1974. Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination test for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs. Appl. Microbiol. 28:1-4.
100. Myers DM, Varela-Díaz VM. 1980. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. Cornell Vet. 70:258-265.

101. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Brucellosis: an Overview. Emerging Infectious Diseases. Vol 3 N° 2.
102. Nava VC. 1993. Frecuencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en perros sacrificados en el antirrábico del municipio de Naucalpan de Juárez durante marzo-agosto de 1992. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. UAEM. Toluca, Edo. De México.
103. Nicolet J. 1985. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. España. Ed. Acribia.
104. Nicoletti P. 1987. The use of antibiotics to control canine brucellosis. Compend Small Animal 9: 1063-1065.
105. Nicoletti P. 1991. Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. Compend Small Animal 13: 944-946.
106. Niemand HG. 1981. Prácticas de Clínica canina. Edit. Continental. México.
107. Orduña A., Bratos Perez M.A, Abad Fernández R, Ruiz García L, De Frutos Serna M, Rodríguez Torres A. 2001a. La Brucelosis, etiología y origen de la infección humana. En: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. p 13-20
108. Orduña A, López L., Miguel MA, Gutiérrez P, Fernández JM, Torres AR. 2001b. Patogenia de la Brucelosis humana. En: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. p 99-111.
109. Osterman B, Moriyon I. 2006. International Committee on Systematics of procaryotes, subcommittee on taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:1173-1175.
110. Peña AM, Butron GD. 1991. *Brucella canis* asociada a lesiones cutáneas en perros, presentación de un caso. Rev Vet 2: 21-23.
111. Percy DH, Egwu IN, Jonas AM. 1972. Experimental *Brucella canis* infection in the monkey (*Macaca aractoides*). Canad J. Camp. Med. 36:221-225.
112. Pickerill PA. 1970. Canine brucellosis: serological host range, and epidemiological studies. Thesis. Cornell University. Ithaca, New York.
113. Pollock RV. 1979. Canine brucellosis: current status. Compendium on continuing education for the small animal practitioner 1: 255-267

114. Ramírez H. 2005. Prevalencia de Brucelosis canina en dos Distritos de la Provincia Constitucional del Callao. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima. 52p.
115. Ramírez PC. 1978. Evaluación terapéutica de la oxitetraciclina micronizada insoluble en perras infectadas artificialmente con *Brucella canis*. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. UNAM, México D.F.
116. Ramis, CR. 2000. Reseña sobre el uso de cepas vacunales lisas y rugosas de *Brucella abortus* y sus posibles riesgos. Boletín veterinario. Suplemento técnico del Colegio Veterinario de la pcia. de Buenos Aires, Argentina. 15:57-61.
117. Reike J, Rhoades H. 1975. *Brucella canis* isolated from the eye of a dog. JAVMA 176: 583-584
118. Reyes F. 1977. Diagnóstico serológico de Brucelosis canina causada por *Brucella canis* en Lima Metropolitana. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima. 26p.
119. Rodríguez SC, Carmichael LE, Suárez GF. 1994. Estandarización de un antígeno de *Brucella canis* (M-) para el diagnóstico de brucelosis canina por medio de la prueba de aglutinación en placa. En: XIV Congreso Panamericano de Ciencias. Acapulco, México.
120. Root- Kustritz. 1999. Brucellosis. Current information on reproductive diseases. Trabajo presentado al curso: Reproducao em caes e gatos del Congreso Brasileiro de Reproducao Animal. Belo Horizonte.
121. Ross H, Jahans K, MacMillan A, Reid R, Thompson P, Foster G. 1996. *Brucella* specie infection in North Sea seal and cetacean populations. Vet. Rec. 138:647-648.
122. Rusell WC, Raithel WF, Rusell MJ, Morris PE. 1982. Canine Brucellosis. JAVMA 180: 132-133.
123. Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, Weise C, Cloeckert A, Rouot B. 2003. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. Infect. Immun. 71(8):4326-4332.
124. Sánchez ML, Villarroel M, Borie C. 2000. Detección de anticuerpos contra *Brucella canis* en perros y en dos casos humanos. En: XVII Congr. Chil. Infect. Viña del Mar. 81p.
125. Santos S, Arruda S, Borges L, Paulin da Silva L, Pinheiro S, Mascoll R, Alves J. 2004. Comparação de três testes serológicos aplicados ao diagnóstico da infecção de caninos por *Brucella canis*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. Vol. 41 n°2. Sao Paulo Mar/Apr.

126. Schoeb TR, Morton R. 1978. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. JAVMA 172: 598-600
127. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S. 2008. *brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol. 58:375–382. DOI: 10.1099/ijs.0.65356-0. Disponible en: <http://www.cdc.gov/EID/content/14/8/pdfs/1316.pdf>. revisado 27 enero 2011
128. Segura LR. 1976. Estudio bacteriológico y serológico de *Brucella canis* en perros del DF. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. UNAM. México DF.
129. Serikawa T, Muraguchi T. 1979. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. Jpn. J. Vet. Sci. 41:607.
130. Serikawa T, Kondo Y, Takada H, Yamada J. 1984. Head to head type auto-spermagglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucella canis* infection. Jpn. J. Vet. Sci. 46: 41-48.
131. Sharon CK, Lewis DD, Heriberni TN. 1992. Diskoespondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). JAVMA 201: 1253-1257.
132. Shin S; Carmichael LE. 1999. Canine Brucellosis by *Brucella canis*. Diagnostic laboratory and Baker Institute for Animal Health; College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA, 23 Noviembre. Disponible en: www.ivis.org
133. Spink W, Morisset R. 1970. Epidemic canine brucellosis due to a new species: *Brucella canis*. Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. 81:43-50.
134. Swenson RM, Carmichael LE, Cundy KP. 1972. Human infection with *Brucella canis*. Annals. Int. Med. 76:435-438.
135. Teixeira-Gomes A, Cloeckaert A, Zygmunt MS. 2000. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 68(5):2954-2961.
136. The Center for Food Security & Public Health. 2007a. Iowa: College of Veterinary Medicine Iowa State University. [Internet], [13 junio 2007]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_marine.pdf
Revisado 27 enero 2011
137. The Center for Food Security & Public Health. 2007b. Iowa: College of Veterinary Medicine Iowa State University. [Internet], [06 julio 2007]. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>
Revisado 27 enero 2011

138. The Center for Food Security & Public Health. 2007c. Iowa: College of Veterinary Medicine Iowa State University. [Internet], [13 junio 2007]. Disponible en:
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf
Revisado 27 enero 2011
139. Tizard I. 1998. Inmunología Veterinaria. 5° ed. Mcgraw-Hill.
140. Topley W, Wilson G, Miles A. 1983. Principles of bacteriology, virology and immunity. Systematic Bacteriology. 7a ed. Vol. 2: 406-418. Edit. Butler & Tanner LTD. Londres.
141. Ueda K, Saegusa J, Fujiwara K, Mutu S, Okada K, Hasegawa A, Saegusa S, Usui K. 1974. Detection of *Brucella canis* in dogs in the Tokyo area. Jap. J. Vet. Sci., 36: 539-542.
142. Valdivia A, Navarro M, Delgadillo A. 1994. Aislamiento e identificación de *B. canis* a partir de testículo de un canino. XIV Congreso Panamericano de Ciencias. Acapulco, México.
143. Vásquez NJ, Miranda CL. 1995. Determinación de anticuerpos contra *Brucella canis* en humanos, usando un antígeno específico teñido con rosa de Bengala. En : XXVI Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, México.
144. Véliz N, Rosadio R, Barreto D, Castagnino D. 1974. Difusión en agar gel. Prueba de campo para el diagnóstico de la epididimitis a *Brucella ovis*. Rev Inv Pec IVITA-UNMSM. 3(1):23-28. Perú.
145. Verger J, Gate M, Piechaud M, Chatelain R, Ramisse J, Blancau J. 1975. Isolement de *Brucella suis* biotype 5 a Madagascar, chez une chienne, validité du nom d'espèce *Brucella canis*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 126A:57-74.
146. Villalba EJ, Garrido A, Molina JM, Poveda JB, Portero JM. 1992. El hemograma en brucelosis canina. Med Vet. 9:99-104.
147. Wanke, MM. 2006. Brucelosis canina. Temas de Zoonosis III. Cap. 15:148-157.
148. Wright PJ, Bruce WP. 1989. Cytology of the canine reproductive system. Small Animal Pract. 9: 851-871.
149. Zoha SJ, Carmichael LE. 1982. Serological responses of dogs to cell wall internal antigens of *Brucella canis*. Vet Microbiol 7: 35-50.

ANEXOS

ANEXO 1: Mapa satelital de Pucusana

Anexo 2: Formato encuesta