

Artículo original

Relevamiento serológico de brucelosis en caninos que acudieron a consulta en la ciudad de Bahía Blanca

María Alejandra Prochazka¹, Estela Bonzo², Graciela Miceli³ y Eduardo Mortola*¹ Jefa de la Sección Veterinaria de IACA Laboratorios, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina,² Cátedra de Epidemiología,³ Cátedra de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP, Buenos Aires, Argentina.

e-mail: mortola@fcv.unlp.edu.ar

(Recibido 15 de marzo 2017; aceptado 31 de agosto 2017)

RESUMEN

La brucelosis canina, causada por *Brucella canis*, es un motivo importante de falla reproductiva, especialmente en criaderos de perros. La respuesta inmune adaptativa contra *Brucella* spp. involucra la aparición de anticuerpos detectables a partir de las dos semanas postinfección. En el diagnóstico serológico de la brucelosis canina el método más empleado y con el que se obtienen los mejores resultados es la aglutinación rápida en placa (RSAT). El objetivo del presente trabajo fue realizar un relevamiento serológico de brucelosis en caninos que acudieron a consulta veterinaria, entre los años 2013 a 2016, en la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires. Se procesaron por la prueba de RSAT el total de las muestras (437) de caninos atendidos en veterinarias en el periodo establecido. De las muestras analizadas, 17% (77% hembras y 23% machos) resultaron positivas. De los animales positivos, 88% fueron derivados por control preservicio y 12% por presencia de síntomas. El 77% de los animales positivos tenían entre 2 a 5 años de edad. De las muestras analizadas, la raza Ovejero Alemán, Bull Dog Francés, Caniche y Chihuahua fueron las de mayor frecuencia entre los positivos. Este relevamiento serológico presenta una temática original para la zona geográfica elegida y de interés no sólo para la medicina veterinaria sino también para la salud pública por su carácter zoonótico.

Palabras clave: brucelosis canina, relevamiento serológico, Bahía Blanca

INTRODUCCIÓN

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa, contagiosa, de curso sub-agudo o crónico. Produce infertilidad tanto en hembras como en machos, y por su naturaleza zoonótica presenta un riesgo sanitario para propietarios, criadores y demás personas que conviven con el animal infectado¹. El agente etiológico es la *Brucella canis* aunque ocasionalmente se asocia a la brucelosis canina con otras especies de *Brucella*, entre ellas *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*². La transmisión de la enfermedad entre caninos puede ser horizontal, vertical por placenta o a través

ABSTRACT

Serological diagnosis of canine brucellosis in veterinary practice in Bahía Blanca, Argentina

Canine brucellosis, caused by *Brucella canis*, is an important cause of reproductive failure, particularly in kennels. The adaptive immune response against *Brucella* spp. involves the presence of detectable antibodies two weeks after infection. The most widely used serological test is the rapid slide agglutination test (RSAT). The aim of this study was to determine the serological diagnosis of canine brucellosis in veterinary practice in Bahía Blanca, Argentina between 2013 and 2016. From 437 canine serum samples subjected to the RSAT test, 17% (77% females and 23% males) were positive to *B. canis* antibodies. Overall, 88% of positive animals were derived from pre-mating tests, and 12% from animals with symptoms of brucellosis infection. The 77% of the positive dogs were in the range of 2 to 5 years of age. German Shepherd, French Bulldog, Poodle and Chihuahua were the most frequent breeds with positive results. The serological survey presented here, is original to the geographical location and of interest not only for veterinary medicine but also for public health.

Key words: canine brucellosis, serological survey, Bahía Blanca

de la lactancia. La vía sexual es la más común, aunque no se descartan las vías oral, nasal o conjuntival. Los machos infectados diseminan *Brucella* al medio, pudiendo contaminar a machos susceptibles por un lapso de 4 a 6 meses, probablemente por contaminación de la orina con fluidos seminales^{2,3}. La excreción de Brucellas comienza alrededor de 4 a 8 semanas posinfección y puede durar hasta un año y medio, en forma continua o intermitente⁴.

El síntoma principal de la brucelosis en las hembras es el aborto que ocurre generalmente al final de la preñez; si ésta llega a término las crías suelen nacer muertas o tan débiles que sobreviven poco tiempo². En los machos, la

infección causa epididimitis unilateral o bilateral, aumento o atrofia testicular, inflamación de próstata y/o de ganglios periféricos y esterilidad, aunque también puede producir linfadenopatía, discospondilitis, esplenitis y uveítis anterior⁵. El hombre es susceptible a la infección por *B. canis*, aunque no es frecuente y habitualmente se trata de casos leves con buena respuesta al tratamiento⁶.

La respuesta inmune adaptativa contra *Brucella* spp. involucra tres mecanismos principales, que actúan en diferentes etapas de la infección: i) la generación de una respuesta humoral con producción de anticuerpos, ii) la activación de la función bactericida de los macrófagos por acción del IFN- γ producido por células T CD4+ y CD8+ y iii) la lisis de células infectadas por LT CD8+⁷. Los anticuerpos se hacen detectables a partir de las dos semanas posinfección⁸. En forma similar a todas las infecciones por *Brucella*, en la primera fase de la respuesta humoral predomina la IgM que va siendo paulatinamente superada por la IgG que predomina en la respuesta crónica⁹.

El diagnóstico de la enfermedad incluye métodos directos e indirectos. Los métodos directos son aquellos que detectan la presencia del agente o su ácido nucleico en la muestra clínica (sangre, orina, abortos) y entre ellos se pueden mencionar el aislamiento como principal método, especialmente los hemocultivos. Los métodos indirectos detectan la presencia de anticuerpos formados en respuesta a la entrada del agente. La efectividad de las pruebas serológicas actualmente disponibles en el mercado es variable, debido a que los antígenos de superficie de *Brucellas* rugosas pueden reaccionar en forma cruzada con los anticuerpos producidos contra otras especies de bacterias no patógenas. Entre los métodos serológicos más comúnmente empleados se encuentra la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT); es una prueba rápida que no requiere preparación técnica ni instrumental sofisticado para su realización. Emplea una cepa mutante (mucoide) de *B. canis* con alta especificidad. La prueba 2ME-RSAT requiere un tratamiento del suero con 2 Mercapto etanol (0.2M). Otra prueba es la inmunodifusión en gel de agar (AGID): usa antígenos de pared (LPS-R) con problemas de aparición de falsos positivos por reacciones cruzadas³. Presenta las desventajas del diagnóstico más lento (72 horas) y la dificultad de interpretación en animales crónicamente infectados. También se pueden recurrir a ELISA que utiliza como antígeno extractos de la pared celular LPS (lipopolisacárido) de *B. canis* (cepa mucosa) o proteína citoplasmática de *B. abortus* y una prueba de inmunofluorescencia indirecta¹⁰.

Los relevamientos serológicos permiten conocer la circulación de un determinado microorganismo en una población, y permiten determinar las poblaciones de riesgo para la enfermedad, evaluar los mecanismos de transmisión, determinar los grupos de población críticos para mantener la transmisión del agente infeccioso, adecuar las medidas

de control de la enfermedad y proponer soluciones¹¹.

El objetivo de este trabajo fue realizar, en caninos que acudieron a consulta en la ciudad de Bahía Blanca, un relevamiento serológico de brucelosis mediante la prueba de RSAT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las 437 muestras de sangre utilizadas provenían de caninos que ingresaron a la sección veterinaria de un laboratorio privado de la ciudad de Bahía Blanca, entre octubre de 2013 y agosto de 2016. Las muestras procedieron en su mayoría de animales de criaderos de distintas razas de la ciudad de Bahía Blanca, o que habían sido comprados en dichos criaderos. La totalidad de los perros analizados tenían propietario y gozaban de un buen estado general al momento de realizar el análisis.

Se procesaron por la prueba de RSAT el total de las muestras (437) de caninos llevados a consulta para chequeos de rutina o preservicio en el período analizado.

Para la detección de anticuerpos se empleó la técnica de seroaglutinación rápida en portaobjeto (RSAT) con antígeno *Brucella canis* (cepa M-) coloreado con Rosa de Bengala (provisto por SENASA). Este antígeno utiliza una suspensión de *B. canis* M- inactiva y coloreada con Rosa de Bengala. Brevemente, el desarrollo de la técnica consiste en colocar con una micropipeta 15 μ l de suero sobre una superficie de vidrio limpia. Adyacente al suero colocar 15 μ l del antígeno. Mezclar ambas gotas con el tip (individual para cada suero) o un peine mezclador, en forma de círculo de 1,5 - 2 cm de diámetro. Observar hasta transcurridos 2 minutos, imprimiendo movimientos en forma rotativa. Realizar paralelamente un suero control positivo y uno negativo. RESULTADO POSITIVO: se formarán grumos rosados quedando transparente el fondo.

RESULTADO NEGATIVO: la mezcla permanecerá de color rosado homogéneo.

Con los resultados obtenidos, se realizó el análisis exploratorio (frecuencias), de los datos mediante Epilnfo V 7. En los casos que correspondía se aplicó la prueba no paramétrica de diferencia para dos proporciones ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

Se obtuvieron resultados de las 437 muestras de suero. La mayor cantidad de muestras remitidas se observó en el año 2014, la proporción total de machos fue de 26%, y la edad promedio general fue de 3,3 años con una desviación típica de 2,1 años (Tabla 1). Más de la mitad de los perros (54%) analizados tenían entre 2 y 3 años (Figura 1); la distribución por razas se describe en la Figura 2. El motivo más frecuente de consulta (92%) del total de las muestras fue chequeo preservicio (Figura 3).

De las muestras analizadas, 17% (75/437) resultaron

Tabla 1: Distribución de caninos analizados durante octubre 2013 – agosto 2016 según sexo y edad

Muestras analizadas	2013	2014	2015	2016	Totales
Número de muestras	57	164	112	104	437
Machos	10	45	37	23	115 (26%)
Hembras	47	119	75	81	322 (74%)
Edad promedio (años) \pm DS	3.7 \pm 2,0	3.2 \pm 2,0	3.2 \pm 2,2	3.07 \pm 2,0	3.3 \pm 2,1

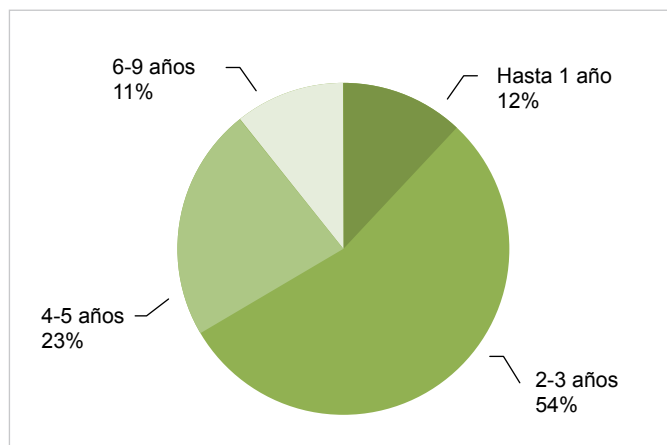


Figura 1: Resultados positivos a la detección de anticuerpos para brucelosis según rango etario

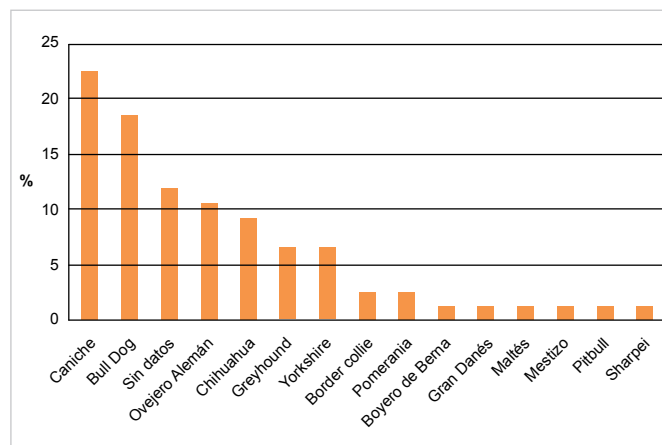


Figura 2: Resultados positivos a la detección de anticuerpos para brucelosis según razas. Frecuencia por raza menores a 5 individuos se agruparon en la categoría "otras".

positivas a la prueba de RSAT, correspondiendo 17 de ellas a machos y 58 a hembras. La proporción de resultados positivos en los machos fue del 15% (17/114) y en las hembras fue de 18% (58/323). No se observaron diferencias significativas ($p=0,46$) entre proporciones de resultados positivos según sexo.

DISCUSIÓN

La prevalencia de la brucelosis canina en América y en Argentina es muy variada. Esta enfermedad ha sido informada en México, América Central y América del Sur¹²⁻¹⁴ con rangos de seroprevalencia de hasta el 30%. En la Argentina un trabajo¹⁵ informa que el 30.5% de los sueros de 131 perros vagabundos capturados de Moreno, provincia de Buenos Aires, presentaban anticuerpos anti-*B. canis* y de 6.2% de ellos se aisló la cepa. En el mismo año se comunicó la infección¹⁶, demostrada por el aislamiento de *B. canis*, en un médico veterinario en la provincia de Córdoba, que había efectuado un tacto uterino a una perra de la cual también fue aislado el germen. Un trabajo¹⁷ realizado en una población de 1100 perros, en Gral. Pico, provincia de La Pampa, encontró 58 (5.3 %) animales positivos a la prueba de IDGA y en 16 (27.6%) de ellos aislaron *B. canis*. Más recientemente¹⁸ se encontró 4.4% de casos serológicamente positivos a la prueba de IDGA en 316 perros de barrios carenciados de la Ciudad de Buenos Aires estudiados durante 2002-2003. Un estudio posterior del mismo autor informa sobre 5.9% de casos positivos a la misma prueba realizada en una población de 272 perros de distintos barrios de la ciudad de Buenos Aires. En un estudio¹⁹ en 219 perros de barrios carenciados de la Capital Federal se obtuvo un 3% de seropositivos. En el año 2009²⁰ se realizó un estudio en el partido de Lomas de Zamora, provincia de Buenos Aires, donde el 14.7% de 224 perros analizados, resultaron positivos a la prueba de RSAT y se confirmaron con la prueba de ELISAI el 10.7%.

El diagnóstico canino de la infección por *B. canis* puede resultar difícil, debido a la inestabilidad de los títulos de anticuerpos séricos que varían de acuerdo a la fase de la enfermedad, sea aguda o crónica así como entre los diferentes métodos empleados en su detección. El diagnóstico se basa en el aislamiento del agente, difícil de realizar y fundamentalmente en la evidencia serológica, usando pruebas de aglutinación o de inmunodifusión en gel de agar. El aislamiento bacteriológico es el estándar de oro, sin embargo debido a que la bacteria se expulsa en forma intermitente, un cultivo negativo no se puede utilizar como

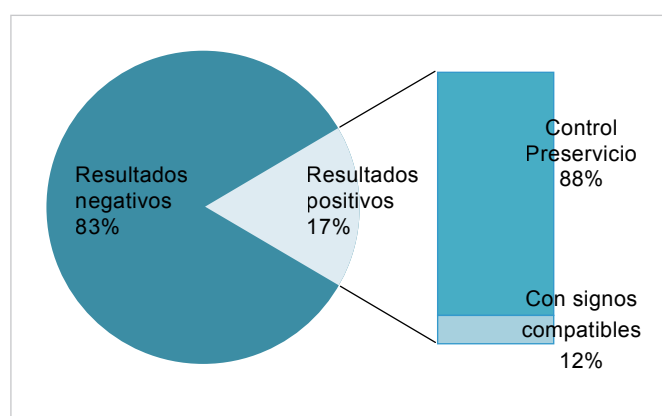


Figura 3: Motivo de consulta según resultados a la detección de anticuerpos para brucelosis. La signología clínica compatible con Brucelosis fue aborto (en el último periodo), orquitis, uveítis y dolor articular

criterio de exclusión de presencia de brucelosis canina.

En este estudio, empleamos la técnica de RSAT descrita por Carmichael y Joubert (1987)²¹, dado que es la técnica de elección en cuanto a sencillez, rapidez, sensibilidad y especificidad demostrada. Keid y col. (2009)²² reportaron una comparación entre tres técnicas diagnósticas: RSAT, 2MERSAT y IGDA para brucelosis canina, y establecieron una sensibilidad diagnóstica de 70.58%, 31.76% y 52.94% y una especificidad diagnóstica de 83.34%, 100% y 100%, respectivamente. Dada la baja sensibilidad de las pruebas de 2ME-RSAT e IGDA, no estarían indicadas en relevamientos serológicos, por la aparición de resultados falsos negativos, reindicando el uso del RSAT en estudios de prevalencia.

En referencia a la seroprevalencia asociada al sexo, el 74% de la muestra estuvo compuesta por hembras, en las cuales se encontró que el 18% tenía serología positiva, este alto porcentaje podría deberse al tipo de transmisión de la enfermedad en las hembras dentro del criadero (secreciones vaginales, fetos y placenta), sin descartar la transmisión láctea que podría ser una forma de diseminación del agente. En cuanto a los machos representaron el 26% del total de la muestra y el 15% presentó serología positiva; la transmisión de la infección por semen y por orina dentro del criadero podría ser una importante fuente de diseminación de la brucelosis.

En el presente estudio realizamos un relevamiento

serológico de la brucelosis en caninos domésticos de la ciudad de Bahía Blanca y dado que no existen datos previos, presenta una temática original para la zona geográfica elegida y de interés no solo para la medicina veterinaria sino también para la salud pública, por ser esta enfermedad una afección zoonótica. El porcentaje de animales seropositivos hallado en este estudio, supera en gran medida los resultados obtenidos por otros autores en otras zonas del país. Sin embargo, teniendo en cuenta las características de esta enfermedad, como la de los animales analizados, habría que considerar la posibilidad de que el número de resultados positivos obtenidos en este estudio, podría deberse a un mal manejo a nivel de los criaderos y no a la presencia tan elevada de la enfermedad en la

población canina de la ciudad de Bahía Blanca. Se plantea la posibilidad futura de analizar animales seleccionados aleatoriamente de la población canina en estudio.

Otro punto a considerar es la presencia de esta enfermedad en la población humana, tanto en los propietarios como en los criadores, ya que en la mayoría de los casos los animales serológicamente positivos eran asintomáticos. De esta manera se abre una nueva incógnita respecto de esta zoonosis y de su prevalencia a nivel poblacional, no solo canina, sino también humana.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

BIBLIOGRAFIA

1. Briseño González H, Páramo Ramírez RM, Flores Castro R, Suárez Güemes F. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. Vet México 2004; 35: 121-128.
2. Shin SJ, Carmichael L. Canine Brucellosis caused by *Brucella canis*. En: L. Carmichael Ed. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. IVIS Ithaca NY 1999. (www.ivis.org) A0101.1199
3. Carmichael LE, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. Cornell Vet 1987; 77: 3-12.
4. Serikawa T, Muraguchi T, Yamada J, Takada H. Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs. Jikken Dobutsu 1981; 30: 7-14.
5. Wanke MM. Canine brucellosis. Anim Reprod Sci 2004; 82-83: 195-207.
6. Ardoino SM, Baruta DA, Toso RE. Brucelosis Canina. Ciencia Veterinaria 2006; 8:1, 51-55.
7. Estein, SM. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista Electrónica de Veterinaria REDVET 2006; VII: 05.
8. Johnson CA, Bull RW, Schirmer RG. Peripheral lymphocyte function in dogs with *Brucella canis* infection. Vet Immunol Immunopathol 1983; 4: 425-431.
9. Carmichael LE, Joubert JC, Jones L. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. Vet Microbiol 1989; 19: 373-387.
10. Nielsen K, Smith P, Conde S, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G, Kenny K, Massengill C, et al. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. J Immunoassay Immunochem 2004; 25: 171-182.
11. Cardeñosa Marin N. Estudios seroepidemiológicos. Rev Esp en Salud Pública 2009; 83 (5): 607-610.
12. Flores-Castro R, Segura R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. Cornell Vet 1975; 66: 347-352.
13. Agudelo-Flórez P, Castro B, Rojo-Ospina R; Henao-Villegas S. Canine brucellosis: Seroprevalence and risk factors in pets from eleven neighbourhoods in Medellín, Colombia. Rev Salud Pública 2012; 14 (4): 644-656.
14. García Carrillo C. Animal and human brucellosis in the Americas. Paris: OIE, 1990, p 296.
15. 15 Myers DM, Varela-Díaz VM. Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. Cornell Vet 1980; 70: 258-265.
16. Ramacciotti F. Primer aislamiento de *B. canis* en humano por hemocultivo efectuado en la República Argentina. Rev Med Vet (Bs. As.) 1980; 61: 49-54.
17. Baruta DA, Ardoino SM, Brandan JL, Riesco S, Oriani D, Mariano EL. Estudio seroepidemiológico de brucelosis canina en General Pico, Provincia de la Pampa, Argentina. Veterinaria 2003; 5: 11-6.
18. Lachini R. Comunicación libre A3 y A4, IV Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires, 2004.
19. Boeri E, Escobar GI, Ayala SM, Sosa-Estani S, Lucero NE. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. Medicina (Buenos Aires) 2008; 68: 291-297.
20. López G, Ayala SM, Efron AM, Gómez CF, Lucero NE. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. Rev Arg Microbiol 2009; 41: 97-101.
21. Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. Cornell Vet 1988; 78: 63-73.
22. Keid LB, Soares RM, Vasconcelos SA, Megid J, Salgado VR, Richtzenhain LJ. Comparación de los tests de aglutinación rápida, el de agar gel inmunodifusión, el cultivo microbiológico y la PCR en el diagnóstico de la Brucelosis canina. Res Vet Sci 2009; 86(1):22-26.