



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias
**Especialización en Diagnóstico Veterinario de
Laboratorio**

PLAN DE TRABAJO FINAL INTEGRADOR

**ESTUDIO SEROLOGICO DE BRUCELOSIS EN CANINOS DEL PARTIDO DE
CORONEL SUAREZ, PCIA. DE BUENOS AIRES.**

ALUMNO: Med. Vet. Lautaro Pérez Meyer
DIRECTOR: Dr. Eduardo Mortola
CODIRECTOR: Bact Graciela Miceli

INTRODUCCION

La brucelosis canina es una enfermedad infectocontagiosa crónica, de distribución mundial, que afecta a cánidos domésticos, silvestres y al hombre. La enfermedad es considerada zoonosis, con carácter ocupacional, manifestándose, en el hombre, en forma de fiebre, mialgias, cefalea, dermatitis, linfadenopatía y ocasionalmente poliartritis (Acha y Szyfres, 2001).

La brucelosis en perros se ha reportado en todo el mundo y es endémica en América, Asia y África, donde las encuestas serológicas en numerosos países establecieron una amplia gama de seropositividad, del 1 al 28% (McDermott y col., 2013). En los perros, la enfermedad tiene como principal agente etiológico a *Brucellacanis* (Carmichael y Greene, 1998), pero hay informes de infección por *Brucellaabortus*, *Brucellasuis* y *Brucellamelitensis* (Bicknelly col., 1976; Prior y col., 1976; Sandoval y col., 1976; Barry col., 1986; Miranda y col., 2005).

La infección natural de perros por *B. abortus* es de ocurrencia esporádica y resulta del contacto estrecho de perros, generalmente de zona rural, con bovinos infectados. Los perros se infectan por ingestión de tejidos animales, restos placentarios o fetos abortados contaminados con *Brucellaspp.* (Carmichael y Greene, 1998; Azevedo y col., 2003, Miranda y col., 2005). Los caninos parecen ser más resistente a la infección por *Brucellaspp.* lisas, siendo raras las manifestaciones clínicas derivadas de la infección (Azevedo et al., 2003). Sin embargo, en asociación a la bacteriemia transitoria, algunos animales pueden presentar linfadenopatía y otras manifestaciones de la enfermedad.

La identificación de los perros enfermos es importante porque estos animales constituyen fuentes de infección, ya que pueden eliminar el agente al medio ambiente por orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados o heces (Forbes, 1990; Baeky col., 2003). La presencia y persistencia de *B. abortus* en descargas vaginales de perras por tiempo superior a 42 días después del parto o aborto fue descrita por Baeky col., 2003). Esta descarga, junto con restos de abortos de los perras enfermas, es el material de mayor riesgo en la transmisión del agente a los propios perros y animales de producción (Forbes, 1990).

Agente Etiológico

Brucella spp. pertenece a la familia Brucellaceae. Son bacilos cortos o cocobacilos Gram negativo, con tamaño entre 0,5-0,7 x 0,6-1,5 micras, aerobios, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento. Se trata de parásitos intracelulares facultativos, pudiendo resistir en las células fagocitarias.

Se conocen 7 especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *Brucella ovis*, *B. canis* y *B. maris*. En los últimos años, han sido identificadas nuevas especies lisas: *B. pinnipedialis* (focas, leones marinos, morsas), *B. ceti* (ballenas, marsopas, delfines), *B. microti* (topillos campesinos), *B. vulpis* (zorros rojos), *B. papionis* (babuinos) y *B. inopinata* (implantes en humanos) (Bricker y col., 2000; Dawson y col., 2008; Foster y col., 2007; Scholz y col., 2008; Scholz y col., 2010; Whatmore y col., 2014)

Los reservorios naturales principales para las distintas especies son: vacunos (*B. abortus*), caprinos (*B. melitensis*), porcinos (*B. suis*), ovinos (*B. ovis*), caninos (*B. canis*), roedores (*B. neotomae*) y, además, la recientemente hallada en mamíferos marinos (*B. maris*) (Dawson y col., 2008; Foster y col., 2007; Scholz y col., 2008; Scholz y col., 2010; Whatmore y col., 2014).

De las especies de *Brucella* spp. caracterizadas hasta el presente, cinco son patógenas para el hombre. *B. melitensis* es la más virulenta, *B. suis*, sería la segunda en virulencia en tanto que *B. abortus* y *B. canis* producen infecciones leves, en general son procesos crónicos. Recientemente se han identificado dos casos de infección humana por *B. maris*. Las especies de las que no hay reportes, hasta el momento, como zoonóticas, son *B. ovis* y *B. neotomae* (Nicola, 2009).

Las cepas lisas son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. papionis*. Las cepas rugosas son: *B. ovis* y *B. canis*. *B. vulpis* (sin determinar) (Nicola, 2009).

Las cepas de campo de *B. canis* son siempre rugosas y tienen crecimiento de tipo mucoide (M+) después de varios días de incubación, especialmente en medios con pH 7,2. Si la bacteria desarrolla en medios con pH menor a 6,5 se obtienen variantes M-. Las variantes M- tienen una virulencia reducida, ya que los animales se mantienen asintomáticos y la respuesta inmune evaluada por los test serodiagnósticos

es más débil, especialmente si se utiliza como antígeno (Ag) *B. ovis* (Carmichael y col, 1984a; 1984b).

Patogenia, Epizootiología y Sintomatología Clínica

Cuando las brucellas ingresan al organismo, pasan a la circulación (generalmente linfa), y se multiplican en ganglios linfáticos regionales, colonizan diversos órganos, por ejemplo: tejido mamario, testicular, epidídimo, vesículas seminales, próstata, bazo e hígado.

En el caso de una hembra gestante, la *Brucella* spp. en el feto se acantona en la placenta, intestino, estómago y pulmón. En el útero gestante, la *Brucella* spp. proliferan con rapidez en el epitelio que reviste las vellosidades embrionales del corion, esto produce necrosis de las mismas que poco a poco debilita la unión entre la placenta materna y la fetal. Las vías de eliminación de la *Brucella* spp. son: 1) descargas vaginales de hembras infectadas antes del parto o aborto y hasta 3 - 4 semanas posteriores a él; 2) materia fecal de cachorros lactantes con leche contaminada o como portadores silentes; 3) semen de machos enfermos; 4) la excreción por orina se inicia unas pocas semanas después del comienzo de la bacteriemia y continúa por lo menos 3 meses, mas comprobable en canis; 4) La transmisión venérea puede prolongarse por varios años esta característica es en perros y cerdos.

La transmisión entre caninos puede ser horizontal o vertical por la placenta o a través de la lactancia. La vía sexual es la más común, aunque no se descartan las vías oral, nasal o conjuntival (Shin y Carmichael, 1999). Los machos infectados diseminan *B. canis* al medio, pudiendo contaminar a machos susceptibles en un lapso de 4 a 6 meses, probablemente por contaminación de la orina con fluidos seminales (Carmichael y Joubert, 1988; Briseño González y col., 2004). La excreción de *Brucella* comienza alrededor de 4 a 8 semanas post infección y puede durar hasta un año y medio, en forma continua o intermitente (Serikawa y col., 1981).

La brucelosis canina es una enfermedad infecciosa cuyo síntoma principal 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 tiempo. El aborto ocurre en el 75% de los casos entre los 45-55 días de gestación, en tanto que en el resto puede ocurrir aborto temprano, con expulsión o reabsorción. Esta última situación puede pasar desapercibida para el propietario, que sólo nota una falla en la

concepción (Shin y Carmichael, 1999). 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, discoespondilitis, esplenitis y uveítis anterior (Wanke, 2004).

Riesgo Zoonótico

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 tratamiento (Ardoino y col., 2006). Esta enfermedad ha sido informada en países de América Central, América del Sur, el sur de EE.UU., Japón, China y esporádicamente en Europa (Carmichael y Shin, 1996).

La transmisión al hombre puede ser por contacto con el semen, orina, descargas vaginales, placenta y/o fetos abortados de animales infectados, cuya apariencia es muchas veces saludable. Una situación descrita de riesgo para la dispersión y su transmisión al hombre son los criaderos, que no realizan reposición controlada e introducen nuevos animales o los intercambian para los servicios sin análisis previos (Polt y col., 1982; Shin y Carmichael, 1999).

Respuesta Inmune

En la respuesta inmune a *Brucella* spp. están involucrados mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa. Luego de la infección, la bacteria es rápidamente fagocitada por los polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) en los que sobrevive y se multiplica (Enright, 1990). Los PMNN facilitan la diseminación de las bacterias ya que le sirven de protección frente a anticuerpos y complemento y las transportan hacia los tejidos linfoides y los órganos del sistema retículo endotelial donde la bacteria infecta a los macrófagos y se multiplica en su interior (Spector y col., 1973; Canning y col., 1988; Eze y col., 2000)

La respuesta 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 interferón gamma (IFN- γ) producido por células T CD4+ y CD8+ y iii) la lisis de células infectadas por linfocitos T (LT) CD8+ (Estein, 2006).

Los anticuerpos se hacen detectables a partir de las dos semanas pos-infección (Johnson y col., 1983). En forma similar a todas las infecciones por *Brucellaspp.*, en la primera fase de la respuesta humoral predomina la IgM que va siendo paulatinamente superada por la IgG que predomina en la respuesta crónica. La respuesta inmune es más débil y de menor duración con la exposición a cepas M- que con la exposición a cepas de campo M+ en los tests de serodiagnóstico, especialmente cuando se usa como antígeno *B.ovis* (Carmichael y col., 1984a, b).

La alteración de la barrera hematotesticular implica que determinantes antigénicos espermáticos pasen a la circulación periférica, desencadenando una respuesta autoinmune del animal. Este hecho explica la autosensibilización del animal enfermo, aparición de anticuerpos antiespermáticos y reacciones de hipersensibilidad tardía, además de perpetuar la orquitis y epididimitis y mantener la azoospermia (Borie y col., 2002). De esta manera, los perros infectados con *B. canis* luego de 3 meses desarrollan anticuerpos séricos que aglutinan los espermatozoides caninos. También han sido observados anticuerpos en plasma seminal de perros infectados en forma crónica. El plasma seminal de perros infectados contiene un factor citofílico para los macrófagos esplénicos normales que causa la adherencia del espermatozoide a los macrófagos. Además, los perros con bacteriemia mayor a 4 meses presentan una reacción de hipersensibilidad retardada ante extractos solubles de testículo canino. En los perros infectados que presentan atrofia testicular la respuesta es más severa (George y Carmichael, 1984).

Brucellaspp. es capaz de replicarse en el medio ambiente intracelular, por lo que se asume que una respuesta inmune celular es de vital importancia para eliminar o proteger el huésped de la infección por este microorganismo. Los linfocitos T, juegan el papel más importante en el control y la resolución de esta infección (Oliveira y Splitter, 1996). La producción rápida de interleuquina (IL-12) durante la infección con *B. abortus*, también es de vital importancia para activar las células Th1 productoras de IFN γ y de esta manera contribuir a la inducción de la resistencia celular adquirida (Saldarriaga y RugelesLopez, 2002).

Se ha propuesto como hipótesis que las células TCD8+ anti-*Brucellaspp.*, pueden inhibir la producción de IL-10 (Oliveira y Splitter, 1996), citoquina que está involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune protectora, inhibiendo el patrón Th 1 (linfocitos helper) (producción de IFN γ) o bloqueando las citoquinas inducidas por la activación del macrófago (Fernandes y Baldwin, 1995; Fiorentino y

col. 1991). Los cultivos de linfocitos T derivados de diferentes hospederos como humanos, ratones y bovinos proliferan, mostrando un perfil de citoquinas Th1, en respuesta a la infección por *Brucella* spp. (Oliveira y col., 1998). La inducción de una respuesta Th2 parece ser contraproducente para el control de la infección causada por estas bacterias (Saldarriaga y RugelesLopez, 2002).

Diagnóstico

Métodos directos. 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 puede mencionar el aislamiento como gold standard (principal método), especialmente los hemocultivos, o muestras de órganos linfáticos.

En perros se utiliza el hemocultivo, se realiza cuando existen resultados positivos a técnicas de diagnóstico indirecto, se indica la realización de pruebas adicionales por los periodos de bacteriemia prolongada (Kiatiseewee y col., 1997).

Métodos indirectos: Los métodos indirectos son aquellos que detectan la presencia de anticuerpos inducidos en respuesta al contacto con *Brucella* spp. La efectividad de las pruebas serológicas, actualmente disponibles en el mercado, es variable debido a que los antígenos de superficie de cepas rugosas, pueden reaccionar en forma cruzada con los anticuerpos producidos contra otras especies de bacterias no patógenas.

El diagnóstico de laboratorio para *B. canis* rutinariamente incluye las pruebas de aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT) y la inmunodifusión en gel de agar (AGID). Estas dos pruebas tienen una cierta falta de especificidad dado que los antígenos de superficie de *Brucella* rugosas reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos producidos por otras especies de bacterias no patógenas (Shin y Carmichael, 1999). Debido a esto se han refinado las técnicas, implementándose una prueba RSAT utilizando un antígeno M-, una AGID que utiliza antígenos proteínicos citoplasmáticos y pruebas de ELISA e IFI. El uso de un antígeno proveniente de una variante M- de *B. canis*, en reemplazo del antígeno de *B. ovis*, reduce la tasa de falsos positivos. El antígeno M- teñido con Rosa de Bengala es más sensible que los antígenos comerciales de *B. ovis*. (Carmichael y Joubert, 1987). En la prueba de AGID, la modificación tendiente a disminuir los falsos positivos consiste en utilizar un complejo antigénico con al menos 3 antígenos incluyendo el 2-R, el cual no está presente en

ninguna otra bacteria Gram negativa (Carmichael y col., 1984b). El ELISA indirecto propuesto como diagnóstico, se aconseja para ciertos casos que han sido positivos a RSAT, como una prueba complementaria después de ésta, aumentando la especificidad (Serikawa y col., 1989; Lucero y col., 2002). Otros autores citan el uso de ELISA indirecto utilizando como antígeno un lipopolisacárido rugoso (RLPS) obtenido de un cultivo de *B. canis*, lográndose en este caso una mayor especificidad y sensibilidad (Nielsen y col., 2004).

Para el diagnóstico de *B. abortus*, el Servicio Nacional de Sanidad Animal establece como pruebas oficiales de diagnóstico, la prueba rápida de antígeno buferado en placa (BPA), seroaglutinación lenta en tubo (SAT) o prueba de Wright, prueba de 2 mercaptoetanol (2-ME), prueba de fluorescencia polarizada (FPA). También son oficiales las pruebas de fijación de complemento, ELISA-I (indirecto) y ELISA-C (competición).

Tratamiento y Control

El tratamiento de la brucelosis canina, en términos generales, es costoso, no es alentador y esto guarda relación con las características de la bacteria en su ubicación intracelular y que coloniza tejidos donde la perfusión de ciertas drogas es escasa. (Shin y Carmichael, 1999).

Aún no se ha encontrado una antibioticoterapia totalmente efectiva para la erradicación de la bacteria. Existen reportes sobre el uso de diferentes antibióticos y los porcentajes de éxito son muy variables. La indicación sería, castración y tratamiento con antibióticos, como forma de evitar la diseminación (Wanke y col., 2006).

Los mejores resultados consideran la asociación de dos o más antimicrobianos por períodos prolongados; incluyendo tetraciclinas y estreptomina por hasta 3 meses. Debido a las recidivas después de la finalización del tratamiento, se han utilizado combinaciones antibióticas que generalmente incluyen doxicilina con estreptomina o rifampicina durante 6 semanas. Otros esquemas, incorporan gentamicina o netilmicina como alternativas a la estreptomina. La terapia no mejora la fertilidad de los machos en fase crónica y en la hembra gestante sólo evita el aborto (Maurin y Raoult, 2001).

Los intentos por desarrollar una vacuna conveniente que induzca inmunidad, sin provocar respuesta serológica que interfiera con el diagnóstico, en la actualidad no

han sido exitosos. En los criaderos se debe tener como norma de control el relevamiento serológico de rutina y la eliminación de animales infectados, además del control serológico previo a la introducción de un nuevo animal al establecimiento. Se sugiere para los criaderos 2 pruebas serológicas negativas con 4-6 semanas de intervalo para permitir el ingreso de un animal al grupo de reproducción. Las hembras usualmente deben monitorearse antes del celo (Shin y Carmichael, 1999). La prevención de la infección y la eliminación de los perros infectados debe ser la principal estrategia de control en los criaderos.

Se sugiere también, para controlar la enfermedad, que los médicos veterinarios, soliciten un análisis de brucelosis previo a un servicio, tanto de la hembra como del macho.

OBJETIVO GENERAL

- Realizar un estudio serológico de brucelosis en caninos del Partido de Coronel Suárez, Pcia. De Buenos Aires, Argentina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar las técnicas de rutina para el diagnóstico serológico de *B. abortus* y *B. canis* en los caninos muestreados y relacionarlo con la fuente de infección.
- Conocer la situación epidemiológica de la brucelosis canina en la zona muestreada, resaltando su importancia zoonótica.

HIPOTESIS

En el Partido de Coronela Suarez existese serología positiva a *B. abortus* en caninos rurales y urbanos.

IMPORTANCIA DEL TRABAJO

Este estudio serológico de Brucelosis en caninos del Partido de Coronel Suarez, como trabajo final integrador de la Carrera de Especialización en Diagnóstico

Veterinario de Laboratorio, presenta una temática original para la zona geográfica elegida. Tiene por finalidad resaltar que si bien no existen datos epidemiológicos sobre la infección humana por *B. abortus* a través de perros, este trabajo revela por primera vez el análisis de una población canina en Argentina que es serológicamente positiva a *B. abortus*, y enfatiza la importancia de la transmisión zoonótica de las enfermedades en un área rural.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio de tipo descriptivo y observacional, empleando muestras de sangre provenientes de caninos (machos y hembras) con propietario, derivadas de castraciones llevadas a cabo por el Dto.de Bromatología de la Municipalidad de Coronel Suarez y tres veterinarias privadas de Coronel Suarez, Provincia de Buenos Aires, durante los años 2017 y 2018. Se estudiaron animales con dueños que hubieran otorgado su consentimiento informado para la toma de la muestra,

Se tomaron entre 3 y 5 ml de sangre de la vena yugular externa y/ocefálica ante braquial, se separó el suero y se conservó congelado a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

La información de cada animal se registró en una ficha excel que contó con los datos de sexo, edad y hábitos de vida (zona rural y/o urbana). Las determinaciones se realizaron en un laboratorio privado de la zona de Coronel Suárez, Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico y Análisis Clínicos "Coronel Suárez". Para detectar anticuerpos anti especies lisas (S) de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) se realizó la prueba de BPA descripta por Angus y Barton, 1984. Es la prueba tamiz oficialmente aceptada en la Argentina para el diagnóstico de brucelosis bovina y fue realizada de acuerdo a procedimientos estandarizados (Alton y col., 1988) con antígeno producido por SENASA. Se emplearon como pruebas confirmatorias la técnica de SAT, 2-ME y FPA. Estas pruebas se realizaron e interpretaron según los procedimientos descriptos por SENASA para el diagnóstico de brucelosis bovina.

Para detectar anticuerpos anti *B. canis* se efectuó la prueba de RSAT, de acuerdo a las recomendaciones de Carmichael y Joubert, 1987 incluyendo en cada portaobjeto un suero control positivo. El antígeno fue producido por el SENASA, utilizando la cepa *B. canis* M-.

Técnicas empleadas:

BPA: es un prueba de aglutinación rápida (8min la lectura) en placa, se realiza una sola dilución, cualitativa, los resultados positivos (aparición de grumos) se continúa con las pruebas complementarias (SAT y 2-ME), los negativos (turbidez homogénea) no se realiza ninguna otra prueba. Se detectan en esta prueba IgG y algunas IgM específicas.

SATy 2-Me: son pruebas de aglutinación lenta en tubo (40-48hs la lectura), cuantitativas. Para la prueba de SAT, se realizan 4 diluciones en solución salina fenolada (1/25, 1/50, 1/100 y 1/200), en esta prueba se pueden determinar IgG e IgM, en la prueba de 2Me, se realizan las mismas diluciones en solución salina con 2-Me, solo se determina IgG, ya que el compuesto con radical tiol, produce alteraciones en los enlaces disulfuros y genera un impedimento estérico sobre las IgM, quedando monómeros que no tiene capacidad de aglutinar. El grado de aglutinación puede clasificarse como completo: unión antígeno/anticuerpo (mezcla) con líquido límpido y a la agitación suave no se rompen los grumos: incompleta: mezcla parcialmente turbia y a la leve agitación no rompe los grumos y negativa: mezcla turbia y la agitación no revela grumos. La interpretación de resultados: negativo, sospechoso y positivo figura en la grilla elaborada por SENASA (Manual de diagnóstico de brucelosis, 2009).

FPA: el mecanismo del ensayo se basa en que una molécula rota al azar, el tamaño molecular es el principal factor influenciando el radio de rotación, así una pequeña molécula rota más rápido que una molécula más grande, si la molécula es marcada con un fluorocromo, el tiempo de rotación es determinado por la medición de la intensidad de la luz polarizada en plano vertical y horizontal, así una molecular grande es limitada emitiendo más luz en un solo plano (mas polarizado) que una pequeña molécula que rotando rápido emite luz depolarizada. El antígeno que se utiliza es un pequeño fragmento de peso molecular, promedio de 22kD, de O-polisacárido (OPS) del lipopolisacarido de *Brucella abortus* 1119-3, conjugado con isotiociano de fluoresceína, se incuba con una dilución 1/100 de suero (10 ul de suero en 1ml de buffer), se esperan 2min y se realiza la lectura en un analizador fluorescente. Los valores se expresan en unidades de milipolarización (mP): Negativo ≤ 94 mP. Sospechoso: 94-105mP y Positivo ≥ 105 mP.

Todas las pruebas se realizan incorporando controles negativos y positivos.

RSAT: Seroaglutinación rápida en portaobjeto con antígeno *Brucelacanis* (cepa M-) coloreado con Rosa de Bengala con y sin 2-Mercaptoetanol, prueba rápida, cualitativa. Se utiliza 10ul de suero + 10ul de antígeno, a los 2m se realiza la lectura, positivo con presencia de grumos y negativo tubidez homogénea sin grumos.

Resultados

Se estudiaron 67 perros (hembras y machos) con un promedio de edad de 4,5 años (rango 1 a 10 años) en las hembras y de 4,6 años (rango 1 a 11 años) en los machos. En referencia a la prueba tamiz de BPA, 12 de los 67 sueros (17,9%) fueron positivos, la reactividad fue 27,7% (10/36) entre los machos y 6,4% (2/31) entre las hembras. Utilizando los criterios de interpretación para bovinos no vacunados en las pruebas confirmatorias, los resultados fueron: 2 sueros (16,6%) positivos a SATy 2-ME (1/200) y 2 sueros (16,6%) positivos a SATy 2-ME (1/100). De estos 4 sueros 3 resultaron positivos a FPA (mP=223, 193 y 194,8) y uno sospechoso (mP=100,7). Otros 2 sueros positivos (16,6%) a SATy 2-ME (1/50), 1 suero positivo (8,3%) a SATy 2-ME (1/25) y 1 suero positivo (8,3%) sólo a SAT (1/25). Los títulos 1/50 y 1/25 se consideraron negativos.

Solo 2 de los animales resultaron positivo a la prueba de RSAT para *B. canis*, y uno solo de ellos resultó también positivo a la prueba de BPA.

Discusión

De todos los perros analizados solo uno de ellos presentó serología positiva a *B. canis*. *Brucella* lisas (*B. abortus*, *B. suis* o *B. melitensis*) expresan la cadena lateral O inmunodominante en el lipopolisacárido de su superficie. Por lo tanto, esta cadena lateral forma la base antigénica de las pruebas de diagnóstico (BPA, SAT y 2-ME), pudiendo detectar especies lisas. Las pruebas para especies de *Brucella* rugosas como *B. canis* difieren de las pruebas para *Brucella* lisas, ya que *B. canis* no sostiene la cadena lateral O en su superficie, la prueba RSAT se usa para su análisis serológico. Por lo tanto, no es posible que los perros infectados por *B. canis* tengan resultados positivos para la prueba de *B. abortus* y viceversa (Mateu-de-Antonio y col., 1994). En el caso de los caninos, no se ha diseñado ni estandarizado, hasta el momento, ensayo alguno para el diagnóstico de la *Brucella* lisas. Los métodos serológicos empleados para la detección de la enfermedad han sido desarrollados especialmente para su aplicación en los bovinos, no existiendo criterios claros y uniformes para su

utilización en los caninos (Vargas, 2002; Mcgiveny col., 2003; Ocholiy col., 2004; Nielsen y col., 2005; OIE, 2006). Las pruebas serológicas oficiales en nuestro país para la especie bovina han sido establecidas por el SENASA en la Resolución 438/2006 (Nicola, 2009). La prueba de FPA es una prueba de referencia internacional y es utilizada en caso de ser necesario corroborar un resultado. No existen antecedentes sobre el uso de FPA para la serología en perros y en el futuro podría constituir una herramienta útil en estos casos, si se establece el punto de corte y la concordancia con las pruebas clásicas de Wright y 2-ME en la especie canina.

En este estudio hemos hallado que del 17,9% de muestras positivas a la prueba tamiz de BPA solo el 5,9% se positivizó a las pruebas confirmatorias de SAT y 2-ME (con resultados mayores o iguales a 1/100) y refrendadas por la prueba de FPA. La presencia de falsos positivos puede deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas que comparten un lipopolisacárido superficial similar al que presenta *Brucella* (Godfroidy col., 2002; Gall y col., 2006). Estas interacciones han sido estudiadas con atención en los bovinos (Mainar-Jaime y col., 2005), por lo que es factible que en los caninos también sean causa importante de interferencia en el diagnóstico de brucelosis.

El análisis de los datos registrados en las historias de casos mostró que todos los perros seropositivos a *B. abortus* vivían en proximidad con ganado también seropositivo a brucelosis y podían tener acceso a fetos abortados y placenta de ganado infectado, o bien eran perros urbanos que tenían contacto cercano con perros que concurrían asiduamente al campo. Las descargas vaginales del ganado positivo a *B. abortus* persisten por más de 40 días después del aborto o parto y se convierten en una fuente de infección para perros (Moreno, 2014). La dosis infecciosa para perros es de aproximadamente 10^6 a 10^{10} organismos/g (Pidgeon, 1987). La seroconversión en perros infectados por *B. abortus* puede ocurrir entre 5 y 20 días después de la infección y ha sido reportada la excreción de *Brucella* en el medio ambiente a través de la orina o heces (Pidgeon, 1987). Esta vía podría explicar la infección de los perros de zonas urbanas que no han concurrido al campo y que podrían haberse infectado al ingerir heces u orina contaminadas con *Brucella* de los perros de campo.

Según la ley del gobierno Argentino, el ganado seropositivo a brucelosis debe eliminarse bajo un programa de vigilancia para evitar la propagación de la enfermedad. Hasta el momento no hay evidencia que reporte que los perros desempeñen un papel epidemiológico activo en la transmisión de *B. abortus* a humanos o ganado, Sin

embargo, dado que la brucelosis en caninos no es parte del programa de vigilancia, los perros podrían desempeñar el papel de hospedadores reservorios para *B.abortus*. Esta fuente de transmisión no debe ser subestimada, ya que la transmisión cruzada de especies de *Brucella* spp. es posible. Existen reportes de la transmisión esporádica de *B. canis* de los perros domésticos a sus dueños (Hensel y col., 2018). Además, otro informe describe la detección de *B. suis* en perros, advirtiendo sobre la posible transmisión al humano (Ramamoorthy y col., 2011).

Debido a que *B. abortus* es más patógeno para los seres humanos que *B. canis*, las personas con sospecha de brucelosis y en contacto con perros de campo, deberían someterse a la prueba de detección de la infección por *B. abortus*. Si bien el riesgo de transmisión parece ser leve, los perros infectados por *B. abortus* tienen el potencial de infectar el ganado y podrían ser una amenaza de transmisión de brucelosis. La infección de humanos o ganado asociado con perros infectados por *Brucella* podría tener consecuencias políticas y económicas desfavorables. La sola eliminación del ganado reactor no necesariamente puede erradicar la enfermedad, pero la eliminación de los perros que se hallan en contacto con hatos infectados, podría ayudar al control de la enfermedad. Durante los programas de erradicación de la brucelosis, las pruebas serológicas de perros para *B. abortus* pueden ser un indicador valioso (centinela) de la presencia de brucelosis en el ganado bovino (Moreno, 2014). La brucelosis es una enfermedad zoonótica bien distribuida a nivel mundial, y la ingestión de productos lácteos contaminados es el mayor riesgo de brucelosis en áreas endémicas de la enfermedad (Kose y col., 2014). Sin embargo, no se debe subestimar la transmisión potencial de *B. abortus* a humanos en contacto con perros de campo infectados.

Se estima que más del 60% de los patógenos humanos tienen una fuente animal, y la incidencia de una enfermedad se ve afectada por factores ambientales, por lo que diferentes enfoques son válidos para controlar la incidencia de enfermedades zoonóticas (Cutler y col., 2010). Uno de estos enfoques podría ser el concepto de "Una salud", aunque nunca antes se ha aplicado a la transmisión zoonótica de *B abortus* a través de caninos (Day, 2011). Existe la necesidad de crear un marco conceptual para las enfermedades zoonóticas en caninos, aunque el concepto de "Una salud" se ha discutido para las enfermedades emergentes con potencial pandémico (Godfroidy col., 2013; Uçan y Aras, 2015). En otras palabras, el potencial zoonótico de las infecciones de los perros, con la excepción de la rabia, ha sido ignorado en gran medida en todo el

mundo hasta hace poco. Por lo tanto, zoonosis como brucelosis (incluyendo el tipo canino), la equinococosis, la rabia y algunas otras son insidiosas y continúan afectando significativamente la salud humana (Moreno, 2014). Las principales razones para ello son el contacto cercano con los animales al compartir el mismo entorno y las deficiencias en los recursos financieros para controlarlos principalmente en países del tercer mundo.

BIBLIOGRAFIA

Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales brucelosis. 3.ed. Washington: OPS/OMS, 2001. p.28-56 (Publicación Científica y Técnica, 580).

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis Laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.,

Angus RD, Barton CE. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. 3rd. International Symposium on Brucellosis, Algiers, Argelia, 1983. Dev Biol Stand 1984; 56: 349-56.

Ardoino SM, Baruta DA, Toso RE. Brucelosis Canina. Revista Ciencias Veterinarias 2006; 8:1, 51-55.

Azevedo SS, Batista CSA, Alves CJ et al. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. Arq. Inst. Biol., v.70, p.499-500, 2003.

Baek BK, Lim CW, Rahman MS et al. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. Can. J. Vet. Res., v.64, p.312-314, 2003. BAILY Bicknell SR, Bell RA, Richards PA, *Brucella abortus* in the bitch. Vet. Rec., v.99, p.85-86, 1976.

Barr PC, Eilts BE, Roy AF et al. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc., v.186, p.686-687, 1986.

Borie C, Cepeda R, Villarroel M, De Los Reyes M. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. Archivos de Medicina Veterinaria 2002; 34: 111-116.

BICKNELL, S.R.; BELL, R.A.; RICHARDS, P.A. *Brucella abortus* in the bitch. Vet. Rec., v.99, p.85-86, 1976.

Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G., Brew S. Caracterización molecular de cepas de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos. J ClinMicrobiol 38, 1258-1262. 2000.

Briseño González H, Páramo Ramírez RM, Flores Castro R, Suárez Güemes F. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucellacanis*. Veterinaria México 2004; 35: 121-128.

Canning PC, Deyoe BL, Roth JA. Opsonin dependent stimulation of bovine neutrophil oxidative metabolism by *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 1988; 49, 160-162.

Carmichael LE, Greene CE Canine Brucellosis. In: Greene, C.E. (Ed). Infections disease of the dog and cat. 2. ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1998. p.248-257.

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 Veterinarian 1987; 77: 3-12.

Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. Cornell Veterinary 1988; 78: 63-73.

Carmichael LE, Shin SJ. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 1996; 11: 161-165.

Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Developments in Biological Standardization* 1984a; 56: 649-656.

Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Developments in Biological Standardization* 1984b; 56: 371-383.

Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WHM (2010) Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis* 16: 1–7.

Day M. One Health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasite Vector* 2011; 4: 49–55.)

Dawson CE, Stubberfield EJ, Perrett LL, King AC, Whatmore AM, Bashiruddin JB, Stack JA, Macmillan AP (). Caracterización fenotípica y molecular de aislados de *Brucella* de mamíferos marinos. *BMC Microbiol* 8, 224. 10.1186 / 1471-2180-8-224.2008.

Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: *Animal brucellosis* 1990; 301-320.

Estein, SM. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* 2006; VII: 05.

Eze MO, Yuan L, Crawford RM, Paronavitana CM, Hadfield TL, BhattaCHarjee AK, Warren RL, Hoover DL. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infection and Immunology* 2000; 68, 257-63.

Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infection and Immunity* 1995; 63(3):1130-1133.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O-Garra A. IL-10 acts on the antigen/ presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cell. *Journal of Immunology* 1991; 146:3444-3451.

Forbes LB. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., v.196, p.911-916, 1990.

Foster G., Osterman BS, Godfroid J., Jacques I., Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov. *Brucella pinnipedialis* sp. nov. *Brucellaceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 57, 2688-2693. 2007.

Gall D., Nielsen K., Bermúdez R.M., Muñoz Del Real M.C., Halbert G., Groulx R., Moreno F., Chow E.Y. and Checkley S.L. (2006). Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortusequi*. Res. Vet. Sci. 81:215-217.

George L, Carmichael L. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. American Journal of Veterinary Research 1984; 45: 274-281.

Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when inespecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Veter. Microbiol. 90: 461-477.

Godfroid J, Al Dahouk S, Pappas G, Roth F, Matope G, Muma J, Marcotty T, Pfeiffer D, Skjerve E. A "One Health" surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. Comp Immunol Microb 2013; 36: 241–248.

Hensel ME, Negron M, Arenas-Gamboa, AM (2018). Brucellosis in Dogs and Public Health Risk. Emerg Infect Dis 24(8): 1401-1406.

Johnson CA, Bull RW, Schirmer RG. Peripheral lymphocyte function in dogs with *Brucella canis* infection. Veterinary Immunology and Immunopathology 1983; 4: 425-431.

Kiatiseewee S, Nilkumhang P, Sakpuaram T, Theeraleekul T. Canine brucellosis: The 2-Mercaptoethanol - Rapid Slide Agglutination Test and Bacteriological Detection. Kasetsart Journal of National Sciences 1997; 31: 2, 199- 205.

Kose S, Serin Senger S, Akkoclu G, Kuzucu L, Ulu Y, Ersan G, Oguz F (2014) Clinical manifestations, complications, and treatment of brucellosis: evaluation of 72 cases. Turk J Med Sci 44(2): 220–223.

Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *Journal of Medical Microbiology* 2002; 51: 656-660

Mainar-Jaime R.C., Muñoz P.M., De Miguel M.J., Grilló M.J., Marín C.M., Moriyón I., Blasco J.M. (2005). Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in *Brucella*-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Can. Vet. J.* 46: 913-916.

OIE Manual de la sobre animales terrestres. Cap 2.04.03. Brucelosis Bovina. 2008.
Mateu-de-Antonio EM, Martin M, Casal J (1994) Comparison of serological tests used in canine brucellosis diagnosis. *J Vet Diagn Invest.* 6: 257–259.

Maurin M, Raoult D. Use of Aminoglycosides in Treatment of Infections Due to Intracellular Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 2977-2986.
McDermott J, Grace D, Zinsstag J (2013) Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev Sci Tech* 32(1): 249–261.

McGivern J.A., Tucker J.D., Perrett L.L., Stack J.A., Brew S.D., Macmillan A.P. (2003). Validation of FPA and ELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and ELISA. *J. Immunol. Meth.* 278: 171-178.

Miranda KL, Cottorello ACP, Poester FP et al. Brucelosis canina. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, n.47, p.66-82, 2005.

Moreno E (2014) Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol* May 13; 5: 213

Nielsen K, Smith P, Conde S, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G, Kenny K, Massengill C, Muenks Q, Rojas X, Perez B, Samartino L, Silva P, Toilersrud T, Jolley M. 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. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 2004; 25: 171-182

Nielsen K., Smith P., Yu W., Nicoletti P., Elzer P., Robles C., Bermúdez R., Minas A. (2005). Toward single screening tests for brucellosis. *OIE Rev. Scient. Tech.* 24: 1027-1038.

Nicola A. Sebastian E. (2009) *Manual de Diagnóstico Serológico de la Brucelosis Bovina*. SENANA, Buenos Aires, Pp. 95.

OIE. (2006). *Brucelosis Bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres*. Organización Mundial de Sanidad Animal. París, Francia. Pp.: 445-476.

Ocholi R.A., Bertu W.J., Kwaga J.K., Ajogi I., Bale J.O., Okpara J. (2004). Carpal bursitis associated with *Brucella abortus* in a horse in Nigeria. *Vet. Rec.* 155: 566-567.

Oliveira SC, Harms JS, Rech EL, Rodarte RS, Bocca AL, Goes AM, Splitter GA. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31:77-84.

Oliveira SC, Splitter GA. CD8⁺ type 1 CD44^{hi}CD45^{Rb} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II deficient mice. *European Journal of Immunology* 1996; 25: 2551- 57. 30.

Pidgeon GL, Scanlan CM, Miller WR, Mayer TW (1987) Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*. *Cornell Vet* 77: 339–347.

Polt SS, Dismukes WE, Flint A, Schaefer J (1982) Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. *Ann Intern Med* 97(5): 717-719.
Prior MG. Isolation of *Brucella abortus* from two dogs in contact with bovine brucellosis. *Can. J. Comp. Med.*, v.10, p.117-118, 1976.

Polt SS, Dismukes WE, Flint A, Schaefer J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. *Annals of Internal Medicine* 1982; 97: 717-719.

Ramamoorthy S, Woldemeskel M, Ligett A, Snider R, Cobb R, Rajeev S (2011) *Brucella suis* Infection in Dogs, Georgia, USA. *Emerg Infect Dis* 17(12): 2386–2387

Saldarriaga OA, RugelesLopez MT. Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp: Fundamentos para una estrategia vacunal. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2002; 15: 2.

Sandoval LA, Conrado Ribeiro LO, Amaral LBS et al.. Incidência da Brucelose canina nacidade de São Paulo. *Biológico*, v.42, p.128-132, 1976.

Serikawa T, Iwaki S, Mori M, Muraguchi T, Yamada J. Purification of a *Brucella canis* cell wall antigen by using immunosorbent columns and use of the antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 837-842.

Serikawa T, Muraguchi T, Yamada J, Takada H. Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs. *JikkenDobutsu. Experimental Animals* 1981; 30: 7-14.

Schlabritz-Loutsevitch NE. *Brucella papionis* sp. nov., aislado de mandriles (*Papio* spp.). *Int J SystEvolMicrobiol.* 1; 64(Pt 12): 4120–4128. 2014

Scholz HC, Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kämpfer P., Neubauer H. y otros autores (). *Brucellamicrotisp.* nov., aislado del campañol común *Microtus arvalis*. *Int J SystEvolMicrobiol* 58, 375-382. 2008.

Scholz HC, Nöckler K., Göllner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Kämpfer P., Cloeckert A. y otros autores (). *Brucellainopinatasp.* nov., aislado de una infección de implante mamario. *Int J SystEvolMicrobiol* 60, 801-808. 2010.

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.

Spector WG, Reichhold N, Ryan GB. Degradation of granuloma - inducing microorganisms by macrophages. *J. Pathol.* 1973; 103, 339.

Uçan US, Aras Z. The “One Health” concept and a need for national monitoring of canine and feline infections. In: Proceedings of the 1st Turkish Congress of One Health. Konya, Turkey: One Health Congress; 2015. pp. 61–62.).

Wanke MM, Delpino MV, Baldi PC. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). *Theriogenology* 2006; 11: 34-57.

Vargas F. (2002). Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.*90: 39-44.

Wanke MM. Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83: 195-207.

Whatmore AM, Davison N, Cloeckert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz HC, Dick EJ Jr, Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch NE. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J SystEvolMicrobiol.* 2014 Dec;64(Pt 12):4120-8.