

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**



“Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico Veterinario”

Modalidad: Práctica Preprofesional

**SEROEPIDEMIOLOGÍA DE BRUCELOSIS EN ESTUDIANTES DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**

Quiroga, Carolina Elizabeth

DNI: 36.604.881

Directora: Martin, Vivian Adriana.

Co-directora: Fiorimanti, Mariana Rita.

Río Cuarto-Córdoba

Noviembre 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: *“Seroepiemiología de Brucelosis en estudiantes de la Universidad Nacional de Río Cuarto”*

Autor: Quiroga, Carolina Elizabeth.

DNI: 36604881

Directora: M.V. MSc. Vivian Martín.

Co Directora: M.V. Mariana Fiorimanti.

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión
Evaluadora:

Méd. Vet Carlos Motta _____

Méd. Vet. Melina Richardet _____

Méd. Vet Vivian Martín _____

Méd. Vet Mariana Fiorimanti _____

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretaria Académica

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a toda mi familia, en especial a mi madre, a mis amigos y a mi novio que siempre han sido un apoyo incondicional en mi vida personal y universitaria, sobre todo en esta instancia tan importante.

También se lo dedico a las personas que creyeron en mí, y me alentaron a seguir hasta el final.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Directora Vivian Martín y a mi Co-directora Mariana Fiorimanti, quienes siempre me dedicaron su tiempo y colaboración para el desarrollo de este proyecto.

A la cátedra de Enfermedades transmisibles y tóxicas de los pequeños animales, a los profesores y ayudantes alumnos, que me brindaron un lugar siempre que necesité.

Y fundamentalmente, agradezco a mi familia a mi abuela Anita, mi hermano Luciano, mi madre Elena que siempre me escucharon y acompañaron en cada paso que di en esta carrera. Además le agradezco a mis amigos Julieta, Yamile, Cesar, a mi novio David y a mi primo Gaspar, ya que con ellos se hizo más fácil disfrutar el tránsito por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

ÍNDICE

RESUMEN.....	IV
SUMMARY.....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Reseña histórica	3
1.1 Agente etiológico	4
1.2 Taxonomía y especies	5
1.3 Características morfológicas de <i>B. canis</i>	8
1.3.1 Estructura antigénica	8
1.4 Epidemiología de <i>B. canis</i>	9
1.5 Mecanismos de transmisión	11
1.6 Contaminación del medio ambiente	12
1.7. Brucelosis	13
1.7.1 Brucelosis en perros	13
1.8 Patogenia de la brucelosis en humanos	15
1.8.1 Brucelosis en humanos	16
1.9 Respuesta inmune	18
1.10 Diagnóstico	20
1.10.1. Diagnóstico en el perro	20
1.10.2. Diagnóstico de brucelosis humana	21
1.11. Tratamiento	24
1.12. Profilaxis y control	25
OBJETIVOS.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	34
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	44
ANEXO.....	45
ANEXO INFOGRAFIA.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53

RESUMEN

La brucelosis es una infección sistémica producida por la bacteria del género *Brucella*. Constituye una zoonosis importante en salud pública y tiene distribución a nivel mundial con predominio en climas cálidos y tropicales. En la carrera de Medicina Veterinaria de la UNRC, las actividades prácticas académicas durante el cursado pueden implicar un grave riesgo para la transmisión de enfermedades zoonóticas a los estudiantes. Además, la presencia de perros abandonados en el campus y la convivencia a diario con los estudiantes, también constituyen factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad. Estas condiciones epidemiológicas y la falta de conocimiento sobre las medidas de prevención de la Brucelosis podrían ser claves en la presentación de casos serológicos en los alumnos.

A 58 estudiantes que se realizaron los exámenes médicos anuales en la Dirección de Salud de la Universidad Nacional de Río Cuarto durante el periodo abril-noviembre del año 2017, se los sometió a una encuesta elaborada para obtener datos personales y epidemiológicos previo a la obtención de una muestra sanguínea para la detección de anticuerpos de cepas lisas de *Brucella* (*B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*) y cepas rugosas (*B. canis*) en suero. Para el diagnóstico de cepas lisas se realizó la prueba de aglutinación del antígeno en placa bufferado (BPA) y para el diagnóstico de cepas rugosas, la prueba de precipitación RSAT. Como resultado, 1 estudiante reaccionó en forma positiva a la técnica de RSAT, representando una prevalencia de 1,72 %. En cuanto a la prueba de BPA, la totalidad resultó negativa.

Utilizando el Software EpiDat ver 3.1, se analizaron los datos obtenidos para observar si existía relación entre la seropositividad a la enfermedad y algunas variables epidemiológicas. Hubo un mayor índice de mujeres que participaron en el muestreo que hombres, sin embargo, no se encontró asociación en relación a la positividad serológica. La mayoría de los estudiantes encuestados declaró un escaso o nulo nivel de información sobre Brucelosis como enfermedad zoonótica. Esto no debe minimizarse, ya que el desconocimiento constituye un factor de riesgo y determina la necesidad de implementar y difundir medidas de prevención, además de promover la educación sobre esta zoonosis en el ámbito universitario para impedir la aparición de casos serológicos y clínicos en dicha población.

SUMMARY

Brucellosis is a systemic infection caused by the bacteria of the genus *Brucella*. It constitutes an important zoonosis in public health and has worldwide distribution with predominance in hot and tropical climates. In the career of Veterinary Medicine of the UNRC, practical academic activities during the course may involve a serious risk for the transmission of zoonotic diseases to students. In addition, the presence of abandoned dogs on campus and daily coexistence with students are also risk factors for the transmission of the disease. These epidemiological conditions and the lack of knowledge about the prevention measures of Brucellosis could be key in the presentation of serological cases in the students.

A total of 58 students who underwent annual medical examinations at the Health Directorate of the National University of Río Cuarto during the period April-November 2017, were subjected to a survey prepared to obtain personal and epidemiological data prior to obtaining a blood sample for the detection of antibodies of smooth Strains of *Brucella* (*B. suis*, *B. abortus* and *B. melitensis*) and rough strains (*B. canis*) in serum. For the diagnosis of smooth strains, the antigen agglutination test was performed on buffered plate (BPA) and for the diagnosis of rough strains, the RSAT precipitation test. As a result, 1 student reacted positively to the RSAT technique, representing a prevalence of 1, 72 %. Regarding the BPA test, the totality was negative.

Using the EpiDat ver 3.1 software, the obtained data were analyzed to observe if there was a relationship between seropositivity to the disease and some epidemiological variables. There was a higher rate of women who participated in the sampling than men, however, no association was found in relation to serological positivity. The majority of the students surveyed stated little or no level of information about this zoonotic disease. This should not be minimized, since ignorance constitutes a risk factor and determines the need for the implementation and dissemination of measures tending to prevention, in addition to promoting education about this disease in the university setting to prevent the occurrence of serological cases and clinical in said population.

INTRODUCCIÓN

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.” Isaac Newton

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, las zoonosis han tenido un importante impacto negativo dentro del desarrollo de la salud pública. Una de estas patologías transmisibles es la brucelosis, la cual presenta una distribución a nivel mundial con predominio en climas cálidos y tropicales (Rincón Valenzuela, 2009). En países en desarrollo, esta enfermedad representa un grave problema en la industria ganadera por grandes pérdidas económicas. Además, en los últimos años, se ha evidenciado su relación en poblaciones que presentan deterioros en su organización social, política y económica (Córdoba *et al.*, 2015).

La brucelosis es una infección sistémica producida por el género *Brucella*, un grupo de bacterias intracelulares, inmóviles y de crecimiento lento. Se reconocen distintas especies; algunas de ellas afectan a animales terrestres (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti*) y otras a mamíferos marinos (*B. ceti* y *B. pinnipedialis*). *Brucella abortus*, biovar 1-6 y 9, *B. melitensis*, biovar 1-3, *B. suis*, biovar 1,3-5 y *B. canis* son patógenas en humanos. El reservorio lo constituyen especies domésticas de ganado vacuno, porcino, caprino y ovino. Estas cepas, también pueden afectar a bisontes, camélidos americanos, alces, algunas especies de ciervos y de animales silvestres (liebre, zorro, comadreja, etc.). *B. canis* constituye un problema ocasional en perros de criadero y domiciliarios, mientras que en los perros vagabundos la seroprevalencia puede llegar al 20 % (Boeri *et al.* 2008).

En Argentina, el primer aislamiento de *B. canis* se realizó en el año 1978 (Baruta *et al.*, 2003). Los primeros reportes se realizaron en Moreno, Provincia de Buenos Aires, donde Myers y Varela Díaz (1980) informaron que el 30,5 % de los sueros de 131 perros vagabundos capturados, presentaron anticuerpos anti-*B. canis* y en el 6,2 % de ellos se aisló la cepa. Posteriormente, un trabajo de Baruta *et al.* 2003, realizado en una población de 1.100 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*.

En nuestra región, desde el año 2000, a través del Programa de Zoonosis de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), se han realizado estudios en poblaciones humanas y caninas de distintos lugares de la provincia de Córdoba para determinar evidencias serológicas de Enfermedad de Chagas, Toxoplasmosis, Leptospirosis y Brucelosis. Entre los valores de prevalencia de esta última enfermedad, durante el año 2015, se encontraron niveles de anticuerpos en el 24 % de un total de 735 sueros procesados de estudiantes de la UNRC frente a brucelas rugosas. Además, en este estudio se detectó un 11,62 % de reaccionantes positivos a la técnica de RSAT en caninos que deambulan libremente en el campus universitario (Martin *et al.*, 2015).

En la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, las actividades prácticas académicas durante el cursado pueden implicar un grave riesgo para la transmisión de enfermedades zoonóticas a los estudiantes, dado el contacto estrecho que se produce al revisar clínicamente a animales enfermos, al realizar maniobras semiológicas o en la sala de necropsia, entre otras. A pesar de las medidas de bioseguridad que se toman en el ámbito académico, no sucede lo mismo cuando los estudiantes regresan a sus domicilios particulares y tienen contacto con ambientes de riesgo, ya sea por la convivencia con animales infectados o por el contacto directo con canes en la vía pública sin control veterinario. Además, la presencia de perros abandonados en el campus y la convivencia a diario con los estudiantes de la UNRC también representan o constituyen un factor de riesgo para la transmisión de la enfermedad. Estas condiciones epidemiológicas y la falta de conocimiento sobre las medidas de prevención de Brucelosis, podrían ser claves en la presentación de casos serológicos en alumnos que estudian en la Universidad Nacional de Río Cuarto.

1. Reseña histórica

El género *Brucella* es denominado así en honor a David Bruce (Figura 1), un médico inglés quien descubrió el origen bacteriano de la fiebre de Malta en 1887, al estudiar el bazo enfermo de soldados británicos muertos como consecuencia de la enfermedad adquirida durante su estancia en la Isla de Malta.

Los estudios microscópicos de los cortes de bazo de estos pacientes mostraron unas bacterias de pequeño tamaño que se teñían con azul de metileno y con el método de coloración de Gram, aparecían como Gram negativas. David Bruce, consiguió aislar estas bacterias después de inocular muestras de bazo procedente de estos pacientes en un agar enriquecido. Al cabo de 68 hs de incubación a 37 °C aparecieron unas colonias pequeñas y redondeadas formadas por bacterias que morfológicamente y tintorialmente eran idénticas a las observadas previamente en los cortes de bazo de los pacientes fallecidos por fiebre de Malta. La inoculación de las bacterias a un mono le produjo la muerte, aislándose la misma bacteria en el hígado y en el bazo del animal. Esta bacteria fue inicialmente denominada *Micrococcus melitensis* (Orduña Domingo *et al.*, 2001).



Figura 1. David Bruce (Samartino, 2002)

Históricamente, la enfermedad se conocía por otros nombres como Fiebre Ondulante, Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo, Fiebre de Gibraltar (en el hombre), Aborto Contagioso, Aborto Infeccioso (en animales) (Koneman *et al.*, 1999; Acha y Szyfres, 2001). Estos nombres se relacionaban con la sintomatología o el lugar geográfico donde se producía la enfermedad.

Algunos años más tarde, Zammit reconoció el carácter zoonótico de la Brucelosis al demostrar que los soldados se infectaban cuando ingerían leche de cabras portadoras del germen (Lucero, 1996).

B. canis fue detectada en el año de 1963, cuando Carmichael encontró problemas de infertilidad y aborto en criaderos caninos de Estados Unidos. Posteriormente, en 1968 se logró su aislamiento a partir de tejidos fetales y descargas post-abortivas; los microorganismos aislados presentaron características semejantes a las del género *Brucella*, las cuales se corroboraron posteriormente por estudios bacteriológicos y serológicos. Carmichael propuso el nombre de *B. canis* y su inclusión dentro del género *Brucella*, el cual fue aceptado por la Comisión Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (Castillo *et al.*, 2003).

En Argentina se aisló por primera vez en 1930, una cepa de *Brucella melitensis* y desde 1932 se incluyó entre las enfermedades profesionales (Abuin *et al.*, 2006).

En 1994, se describió el aislamiento de *Brucella spp.* en focas, marsopas y delfines en Escocia (Godfroid *et al.*, 2005). En las últimas décadas, se han identificado otras especies, entre ellas *B. microti*, que se aisló de roedores endémicos de la República Checa en el año 2001, siendo reconocida en 2008 como nueva especie (Scholz *et al.*, 2008). Después del análisis genético de diferentes aislados procedentes de mamíferos marinos, se propusieron dos nuevas especies: *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (Foster *et al.*, 2007). Posteriormente, se identificó una nueva especie denominada *B. inopinata*, la que fue aislada de un implante mamario (Scholz *et al.*, 2010). En 2014 se aisló *Brucella* de mandriles, a la que se ha propuesto nombrarla como *B. papionis* (Whatmore *et al.*, 2014). Recientemente, se ha aislado una nueva especie a partir de muestras de nódulos linfáticos de zorros rojos en Austria, la cual ha sido descrita como *B. vulpis* (Scholz *et al.*, 2016).

1.1 Agente etiológico

Brucella son bacterias que pueden persistir en células fagocíticas debido a que se comportan como parásitos intracelulares facultativos. Son cocobacilos Gram negativos, no esporulados, no presentan cápsula ni coloración bipolar y carecen de flagelos. Esta última característica hace que sean inmóviles (Lucero, 1996). Por su metabolismo oxidativo, utilizan nitratos como aceptores de electrones. Los microorganismos son catalasa y oxidasa positivas, no afectan la gelatina ni modifican la leche, y en general, no fermentan azúcares. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. La mayoría de las cepas pierde su viabilidad a los 56 °C, aunque para la esterilización se necesitan temperaturas superiores a los 80 °C. El pH normal de crecimiento oscila entre 6 a 7,4, y mueren a pH menores que 3,5 (Lucero, 1996).

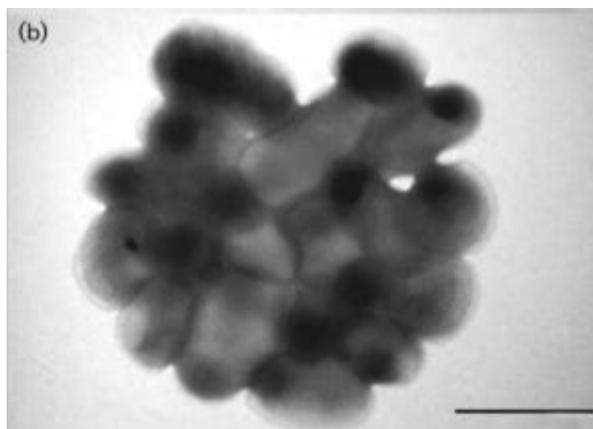


Figura 2. Microfotografía electrónica de barrido correspondiente a *Brucella spp.* (Carambula, 2010).

1.2 Taxonomía y especies

El Manual de Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades ubica a la Brucelosis en el grupo de las enfermedades zoonóticas bacterianas (Alvarez-Hernández *et al.*, 2015). El género *Brucella* es clasificado dentro de la división α (alpha) de la clase Proteobacteria (Figura 3), junto con *Ochrobactrum*, *Mycoplana* y otros, pertenecen a la familia *Brucellaceae* (Garrity & Holt, 2001). Esta familia, a su vez, pertenece al orden Rhizobiales, que incluye a otros géneros que afectan al humano, tales como *Bartonella*, *Afipia*, *Methylobacterium* y *Roseomonas*. Además, está filogenéticamente relacionada con organismos de vida libre del suelo en la que también se encuentran otros patógenos intracelulares animales (*Rickettias*), así como destacados patógenos y endosimbiontes de vegetales (*Agrobacterium* y *Rhizobium*), las propias mitocondrias y ciertas bacterias de la tierra (Moriyón *et al.*, 2001).

Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Alphabacteria
Orden	Rhizobiales
Familia	<i>Brucellaceae</i>
Género	<i>Brucella</i>

Figura 3. Clasificación taxonómica de *Brucella spp.* (Kressler, 2014).

Actualmente, el género *Brucella*, por sus características antigénicas y su hospedador, se encuentra conformado por 12 especies (Figura 3): *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. innopinata*, *B. vulpis* y *B. papionis* siendo un tema aún en cuestión, por decirse que el género *Brucella* posee una sola especie y que las demás únicamente son biovariedades, en el caso de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* por su estructura externa que cada una de estas poseen (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015). Las especies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* son conocidas por su capacidad de infectar al hombre, sin embargo, los agentes que con mayor frecuencia causan la brucelosis humana son *B. melitensis* (98 %) y *B. abortus* (2 %). De acuerdo a las características de las colonias de *Brucella* en medio sólido, pueden ser lisas (S), como *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*, o rugosas (R), como *B. ovis* y *B. canis*. Este aspecto de las colonias es debido a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie de cada especie: LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas; aunque pueden llevarse a cabo mutaciones que afecten a la expresión del LPS. En general, las cepas lisas son las más virulentas. Su ultraestructura es similar a la de algunas enterobacterias, como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Escherichia coli*, entre otras, difiriendo de estas en su membrana externa. También se ha establecido la existencia de diferentes biovariedades en algunas de las especies de *Brucella*. Estas biovariedades se deben a la estructura que presenta la membrana externa en cada una de ellas.

La figura 4 describe las diferentes especies de *Brucella* y sus huéspedes naturales. El rango de susceptibilidad de los huéspedes de especies de *Brucella* es amplio. Casi todas las especies de *Brucella* pueden infectar a otros mamíferos a partir de su principal huésped con la excepción de *B. ovis*, en tales casos, la infección es muy leve e incluso autolimitante. La razón por la que *B. ovis* no es zoonótica en comparación con las demás especies, se atribuye al hecho de que el genoma de *B. ovis* contiene unos elementos móviles genéticos del resto de especies de *Brucella* debido a la degradación del genoma en paralelo con el estrechamiento de la susceptibilidad del huésped de *B. ovis*. Esta degradación y reorganización genómica conducen a la eliminación de la isla genómica 2, que es responsable de la biosíntesis de lipopolisacáridos, además de la inactivación de genes esenciales que regulan la absorción y utilización de nutrientes. Todos estos factores, además de la inactivación de los genes responsables de la síntesis de la membrana externa envuelta de proteínas, conducen a la pérdida de la capacidad de *B. ovis* para infectar humanos y muchas otras especies de mamíferos (Tsolis *et al.*, 2009).

Dentro de los biovares de *B. suis* los más patógenos para el humano son 1, 3 y 4, mientras que el resto sólo tiene capacidad para infectar humanos inmunocomprometidos. A su vez, *B. melitensis* posee mayor potencial zoonótico que *B. abortus*.

ESPECIES	HOSPEDADORES CONOCIDOS	BIOVARIEDADES	TIPO DE COLONIA	ZOONOSIS	AÑO DEL PRIMER AISLAMIENTO
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovinos, canidos, hombre	1-3	Lisa	+++	Bruce, 1893
<i>B. abortus</i>	Bovinos, canidos, hombre	1-6-9	Lisa	++	Schmidt, 1901
<i>B. suis</i>	Cerdos, canidos, hombres	1-3-5	Lisa	++	Huddleson, 1929
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		Rugosa	+	Charmichael y Bruner, 1968
<i>B. ovis</i>	Ovinos		Rugosa	-	Buddle, 1956
<i>B. neotomae</i>	Roedores		Lisa	+	Stoenner y Lackman, 1957
<i>B. ceti</i>	Delfines, marsopas, ballenas		Lisa	+	Foster et al 2007
<i>B. pinnipedalis</i>	Focas		Lisa	+	Foster et al 2007
<i>B. microti</i>	Zorros rojos, roedores de campo		Lisa		Scholz et al 2008
<i>B. innopinata</i>	Humano		Lisa	++	Scholz et al 2009
<i>B. papionis</i>	Babuinos		--		Whatmore et al 2014
<i>B. vulpis</i>	Zorro rojo		--		Scholz et al 2016

Figura 4. Diferentes especies de *Brucella* y sus huéspedes naturales (Sayed y Awad, 2018).

1.3 Características morfológicas de *B. canis*

B. canis es un cocobacilo de 0,5 a 0,7 µm de diámetro por 0,5 a 1,5 µm de longitud, inmóvil, no esporulado, aerobio estricto. Esta bacteria crece en medios como agar sangre y agar tripticosa soya dando colonias rugosas, no requiere suero ni CO₂ para el crecimiento, no produce H₂S y es oxidasa y ureasa positivo. Las cepas de campo de *B. canis* son siempre rugosas y tiene 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-. Además, este microorganismo posee antígenos citoplasmáticos y de pared celular. Carece del antígeno O del LPS, presente en cepas lisas. Los antígenos proteicos citoplasmáticos se han podido caracterizar por SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis) y análisis del polipéptido 35s. Los polipéptidos más usualmente reconocidos en sueros de perros infectados con *B. canis* tienen un peso de 18, 22 y 68 kDa (Carmichael *et al.*, 1989) y los antígenos de pared de las cepas de campo M+ y sus variantes M- pueden ser responsables de la agregación bacteriana en caldos de cultivo acidificados y de la alta viscosidad de las colonias en agar a pH 6,8 (Ardoino *et al.*, 2006).

1.3.1 Estructura antigénica

Las bacterias del género *Brucella* poseen una envoltura celular característica, compuesta por la membrana externa, la membrana interna y un espacio periplásmico intermedio. Los antígenos de la membrana externa de *Brucella* representan el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador, siendo de gran importancia el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de membrana (OMPS) (Figura 5). El LPS es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie es capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con las especies de *Brucella* y comparten epitopes con otras especies bacterianas Gram negativas responsable de la reactividad cruzada en las pruebas serológicas.

Las OMPS se clasifican en mayores y menores de acuerdo con su abundancia relativa hallándose ambas intercaladas en la membrana y estrechamente unidas al LPS (Torioni, 2017).

Las proteínas citoplasmáticas son específicas del género y la mayoría compartida por todas las especies. Algunas de interés diagnóstico, como la glucoproteína A2 termoresistente de 17 kDa, está involucrada en la síntesis de riboflavina y aparece en la fase activa de la infección, y la proteína periplásmica BP26 (Álvarez-Hernández *et al.*, 2015).

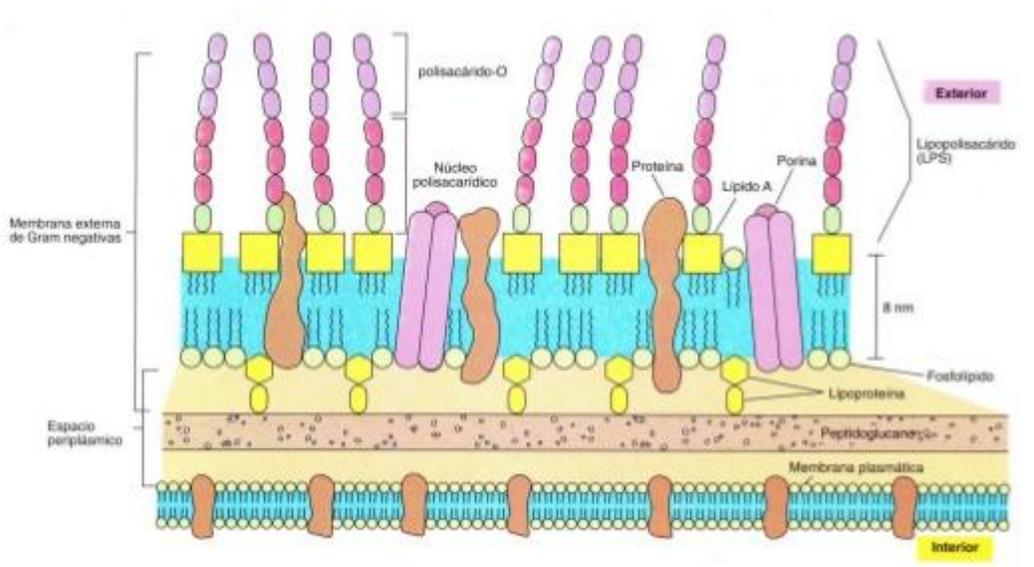


Figura 5. Características estructurales y antigénicas de *Brucella spp.* Ilustración de la membrana externa rica en: FL, LPS, y proteínas, FDC y lípidos de ornitina con AG largos (Rosales-Zambrano, 2014).

1.4 Epidemiología de *B. canis*

Durante los años 1965-66 en Nueva Jersey (EEUU), se produjo una epidemia de abortos en distintos criaderos de perros. Carmichael en 1966 logró aislar el agente causal a partir de tejidos fetales y descargas vaginales post-abortos y demostró, según estudios bacteriológicos, que se trataba de un miembro del género *Brucella*. Simultáneamente, varios investigadores, al estudiar sus características morfológicas, culturales, bioquímicas y serológicas, concluyeron que se trataba de una nueva especie a la que denominaron *Brucella canis* (Carmichael & Shin, 1996.)

Dos años después del primer aislamiento, la enfermedad se había diseminado en casi todo Estados Unidos y en pocos años logró una distribución mundial, afectando a países como Argentina, Chile, Brasil, Canadá, Alemania, Perú, Inglaterra, Japón, Nigeria, entre otros (Borie y Pinochet, 1987).

A diferencia de las brucelas lisas, que afectan varias especies domésticas, *B. canis* tiene un número limitado de huéspedes, encontrándose que sólo los perros y los cánidos silvestres son susceptibles. Los gatos que se infectan de manera experimental, muestran bacteriemia transitoria, pero en términos generales son resistentes. También los conejos y primates enferman por infecciones experimentales. Ninguna otra especie animal presenta títulos de aglutinación importantes (Carmichael y Greene, 1996). Se han encontrado otros animales silvestres como reaccionantes positivos a pruebas serológicas, aunque no se ha realizado el aislamiento de la bacteria y por lo tanto no se ha podido establecer su importancia epidemiológica (Borie y Pinochet, 1987). El perro puede ser portador de una infección brucelar permanente por *B. canis* y,

esporádicamente, por *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. Algunos autores opinan que la infección del perro por brucelas lisas se trata de una enfermedad transitoria y autolimitante de curso benigno, asignando al perro un simple rol de vector mecánico (Galiero *et al.*, 1991). Se cree que la infección natural con estas especies sobreviene después de la ingestión de placentas contaminadas o fetos abortados. Es frecuente que alberguen al microorganismo en los ganglios linfáticos o tracto gastrointestinal por largos períodos (Carmichael y Greene, 1996). *B. canis* infecta al huésped susceptible al penetrar las mucosas, en especial, de la cavidad bucal, vagina y conjuntiva. La dosis mínima infecciosa oral para perros es 10^6 bacterias y la conjuntival de 10^4 a 10^5 microorganismos. Las secreciones vaginales, semen o tal vez orina, son las fuentes de infección más probables para la contaminación por mucosas, ya que su concentración de bacterias es la más alta.

Las perras infectadas sólo transmiten *B. canis* durante el estro, al cruzarse o después del aborto, por medio de contacto oronasal con secreciones vaginales. Es habitual que la transmisión oronasal vía aerosoles ocurra por contacto con material abortado, porque éste contiene hasta 10^{10} microorganismos/ml. Después de un aborto, puede eliminarse *B. canis* alrededor de seis semanas. La leche de estas hembras infectadas contiene menos bacterias y carece de importancia en la infección de los cachorros supervivientes, de hecho, la mayor parte de éstos se infectan en el útero. En perros machos que alojan el microorganismo en su próstata y epidídimo, las principales fuentes de infección son el líquido seminal y la orina. El promedio de aislamiento de *B. canis* a partir del semen de perros infectados es, en términos generales, alto las primeras seis a ocho semanas post-inoculación (PI). Se ha determinado eliminación intermitente de la bacteria en poca cantidad, hasta 60 semanas PI y puede continuar por lapsos cercanos a los dos años. La excreción urinaria comienza pocas semanas después de la bacteriemia y persiste al menos tres meses. En perros machos, se han encontrado concentraciones de 10^3 a 10^6 bacterias/ml de orina mientras que en las hembras, las cifras fueron menores. Antes se pensaba que la orina de machos infectados contenía tan pocos microorganismos que no era infectante por vía oronasal. Sin embargo, estudios recientes demostraron que puede transmitirse *B. canis* de perros maduros machos infectados a otros no infectados después de varios meses o semanas de contacto estrechos. Quizás la propensión de los machos a eliminar la bacteria en orina se deba a su localización en la próstata y epidídimo, que tienen relación estrecha con la vejiga (Carmichael y Greene, 1996). En circunstancias naturales, es menos frecuente la transmisión por medios alternativos. Las vías congénitas o intrauterinas adquieren importancia en la diseminación de la Brucelosis a los cachorros. Luego de distintas prácticas veterinarias, como vaginoscopía, transfusiones sanguíneas, inseminación artificial y uso de jeringas contaminadas, se ha notificado transmisión por fomites (Carmichael y Greene, 1996). 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 (Borie y Pinochet, 1987). El hombre y los primates son regularmente poco sensibles a la infección por *B. canis* (Borie y Pinochet, 1987). En 1967 fue reportado el primer caso de enfermedad

humana por *B. canis*, en 1970 el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC-EEUU) notificó 9 casos más, causados principalmente por accidentes de laboratorio y en menor proporción por contacto directo con caninos infectados.

Aunque se considera que la infección humana por *B. canis* es poco frecuente, se evidencia su implicancia zoonótica. Hasta 1978, se han reportado 17 casos adicionales (Castillo *et al.*, 2003). Las personas con mayor riesgo son aquellas directamente vinculadas con el cuidado de animales, considerándose una enfermedad de tipo ocupacional, principalmente en el rango entre 26 a 54 años, considerado el período de mayor actividad laboral (Castillo *et al.*, 2003). Sin embargo, la predilección de las familias por incorporar perros en sus viviendas es una costumbre muy antigua, cuya consecuencia más directa ha sido la creación de un fuerte lazo afectivo con dichos animales. Así, la convivencia con dichos animales es cada vez más estrecha, especialmente en los niños, quienes ven a sus mascotas como compañeros. Esta costumbre hace que los riesgos de infección sean cada vez mayores (Borie y Pinochet, 1987). La principal fuente de infección en los casos humanos registrados ha sido el contacto con hembras que abortaron (tejidos abortados y descargas vaginales), mientras que otros casos obedecen a machos y fuentes indeterminadas (Borie y Pinochet, 1987; Carmichael y Greene, 1996).

El carácter zoonótico de la Brucelosis canina debe ser considerado debido a la compleja relación de la población canina con los seres humanos y, principalmente, por el estrecho contacto entre canes y niños en el ambiente familiar, siendo de gran importancia conocer los niveles de prevalencia en ciudades con alta población canina (Greene, 2008; Castrillón-Salazar *et al.*, 2013).

1.5 Mecanismos de transmisión

La Brucelosis se transmite al hombre a partir del animal infectado, quien constituye el auténtico reservorio de la enfermedad. La bacteria puede penetrar en el organismo por múltiples vías.

La infección puede producirse a través del tubo gastrointestinal, pero es mucho más frecuente su paso por la orofaringe ya que el pH ácido del estómago puede destruir la *Brucella*, excepto en los casos de inóculo masivo. Los pacientes que utilizan antiácidos, pueden desarrollar Brucelosis rápidamente cuando se exponen a la infección, debido a la ausencia del efecto bactericida de los jugos gástricos.

La ingestión de leche cruda, no pasteurizada infectada y sus derivados es uno de los modos más comunes de transmisión de la enfermedad en zonas endémicas. Los casos que se producen en el medio urbano reconocen en general este origen. El queso fresco, no curado, de procedencia casera, infectado y en consecuencia no sometido a control sanitario también es vehículo de transmisión y en menor medida, carnes poco cocidas, debido a que la carga bacteriana en el tejido muscular animal es baja. Otros productos

animales como hígado o sangre son raramente transmisores de la enfermedad, debido a que no son consumidos crudos habitualmente. No obstante han sido ocasionalmente implicados en la transmisión de la enfermedad (Ministerio de la Nación, 2013). *Brucella* se mantiene viable durante mucho tiempo en alimentos refrigerados, carnes adobadas, salchichas y otros productos chacinados (Lucero, 1996).

Eventualmente, los pozos de donde proviene el agua de los animales contaminan el agua de consumo local a través de filtraciones (Lucero, 1996). También se han descrito brotes hídricos por agua contaminada con aguas residuales de mataderos o por alimentos vegetales de consumo crudo contaminados con abono proveniente de animales infectados, pero no son habituales (Lucero, 1996; Almaraz Gómez y Rodríguez Torres, 2001).

El principal mecanismo de transmisión de la enfermedad lo constituye el contacto con animales infectados o sus productos. Las Brucelas penetran a través de la piel sana o macerada y de la mucosa nasal y conjuntiva. Este mecanismo es el más frecuente en el medio rural y en relación con actividades agrícolas y ganaderas, pudiendo llegar a ser el responsable del 60 al 70 % de los casos registrados. Peones de campo, veterinarios, matarifes, manipuladores de carnes, pieles y otros productos de animales infectados constituyen la población a riesgo de este mecanismo de transmisión, aunque también puede afectar a trabajadores de laboratorio o de servicios de salud (Ministerio de Salud de la Nación, 2013).

Por otra parte, la vía inhalatoria ocurre habitualmente como un riesgo profesional entre pastores, trabajadores de mataderos, carniceros, trabajadores de plantas de procesamiento de carne, veterinarios, trabajadores de la lana, etc. La inhalación de aerosoles es la ruta más frecuente de infección entre los trabajadores de laboratorios, en la que la dosis infectante de *Brucella* en aerosoles es de tan sólo 10 a 100 microorganismos. De hecho, es uno de los microorganismos investigados como potencial arma biológica (Almaraz Gómez y Rodríguez Torres, 2001).

La infección perinatal ocurre por vía transplacentaria, por la ingestión de leche materna o por la exposición a sangre, orina o las heces de la madre infectada durante el parto.

La transmisión interhumana es excepcional, aunque se ha informado posterior a una transfusión de sangre y trasplante de médula ósea y se han descrito casos ocasionales en los que se sospecha transmisión sexual (Ministerio de Salud de la Nación, 2013).

1.6 Contaminación del medio ambiente

Las brucelas son eliminadas por animales infectados, tanto enfermos como asintomáticos, al medio natural a través de productos fetales, leche, sangre y heces, presentando distintos períodos de

supervivencia (Sánchez de Navas *et al.*, 2004). Es destacable la gran resistencia a la desecación de estas bacterias, que contribuye a que puedan permanecer viables durante largo tiempo en la paja y el polvo de los establos (hasta 10 semanas), o en los alimentos como la leche, mantequilla y queso (en algunas variedades de queso hasta 6 meses). Su supervivencia en el medio externo varía mucho en función de las condiciones ambientales. Aunque la luz solar directa las destruye en pocas horas, en determinadas condiciones de humedad y temperatura puede sobrevivir durante varios meses, lo que dificulta todavía más el control de la infección (Blasco, 2001). Excepto en el caso de la adquisición de la enfermedad por ingestión de leche o derivados lácteos contaminados, el riesgo deriva fundamentalmente de exposiciones profesionales a animales o productos biológicos infectados con *Brucella*. La Figura 6, resume los aspectos más relevantes de la cadena epidemiológica de la enfermedad (Almaraz Gómez y Rodríguez Torres, 2001).

Material contaminado	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30min
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	Menos de 1 día
Agua a 8 °C y ph 6,5	Más de 57 días
Fetos mantenidos en la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas	1-100 días
Tierra humedad a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

Figura 6. Material contaminado y tiempo de supervivencia en el medio ambiente de *Brucella spp.*

1.7. Brucelosis

1.7.1 Brucelosis en perros

Una vez que la bacteria entra al organismo, es inmediatamente fagocitada y llevada por vía linfática a los ganglios regionales, lugar donde se realiza la multiplicación bacteriana intracelular. Desde

allí ocurren bacteriemias de carácter intermitente, propias de *B. canis*. A través de la circulación sanguínea, la bacteria invade todos los tejidos, especialmente aquellos ricos en células del sistema retículo endotelial como bazo, hígado y ganglios. Allí nuevamente se multiplica, provocando procesos inflamatorios que dan cuenta de la mayoría de los síntomas. En esta etapa, la bacteria es eliminada por todas las secreciones y excreciones, lo que implica un peligro permanente para los dueños y especialmente para el Médico Veterinario clínico. Si bien la respuesta inmunitaria humoral y específicamente la celular, pueden llevar a la curación espontánea, ésta se ha visto en muy pocos casos. No se sabe cuánto tiempo permanecería inmune un animal recuperado de esta manera.

En la forma crónica, pueden presentarse alteraciones inmunopatológicas tales como arteritis y aglutinación espermática. Esta última se describe como un proceso autoinmune producto de la ruptura de las células epiteliales del epidídimo, próstata y testículo (Borie y Pinochet 1987).

Los síntomas más importantes de la enfermedad incluyen aborto tardío en las perras, epididimitis en machos, infertilidad en ambos sexos, linfadenitis generalizada, uveítis y discoespondilitis (Wanke, 2004). En hembras preñadas ocasiona fallas reproductivas como abortos tardíos que ocurren en el 75 % de los casos entre los 45 a 55 días de gestación; seguidamente hay descargas vaginales o muertes embrionarias tempranas y reabsorción unas semanas después del apareamiento; nacimiento de cachorros débiles que mueren después del nacimiento (Shin y Carmichael, 1999). En diversos estudios se han descrito como signos reproductivos presentes en los machos epididimitis, orquitis, degeneración testicular, infertilidad y dermatitis escrotal. Así mismo aparecen anomalías en las características del semen y eyaculado, tales como eyaculados sanguinolentos, falta de eyaculación, azoospermia o baja concentración espermática. Entre las anomalías que explican la infertilidad de los machos infectados se cuentan células espermáticas inmaduras, retención de gota citoplasmática proximal, colas enrolladas, aglutinación cabeza-cabeza y desprendimiento de cabezas (Borie *et al.*, 2002). Briseño *et al.* (2004) asocian la falta de eyaculación a que la orquitis y epididimitis producen inflamación, dolor o fibrosis que impide la eyaculación, lo que también explicaría la azoospermia. A través del análisis histológico se comprueba que en perros azoospermicos, la espermatogénesis está alterada en los túbulos seminíferos, encontrándose que en general sólo avanza hasta espermátocitos primarios, sin presencia de espermáticas ni espermatozoides. También se describe presencia de glóbulos rojos en el lumen y hemosiderófagos en los túbulos seminíferos, lo que indicaría alteración de la barrera hematotesticular.

Los perros que han sido castrados no tienen signos reproductivos, pero de vez en cuando desarrollan otras afecciones, como enfermedad ocular y discoespondilitis (Ballut *et al.*, 2013). Los caninos también pueden ser afectados por especies lisas de *Brucella* como *B. abortus*, *melitensis* y *B. suis*. La infección por *B. ovis* y *B. neotomae* no se ha comprobado.

1.8 Patogenia de la brucelosis en humanos

La virulencia del germen está relacionada con la capacidad que posee para resistir el efecto bactericida de los componentes del suero normal y su habilidad para adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células, tanto fagocíticas como no fagocíticas (Lucero, 1996; López Merino, 2002).

Un modelo que describe Sánchez-Jiménez *et al.* (2013) sobre la vía oral de infección por *B. canis* en humanos se presenta con el ingreso de la bacteria por vía oral, luego pasa por estómago y se activa, posteriormente ocurre la adherencia, invasión celular y tráfico intracelular (diferencias entre células no fagocíticas y fagocíticas) y finalmente la focalización de la infección.

El tracto digestivo es un ambiente restrictivo para la colonización y multiplicación de microorganismos patogénicos. Esta restricción está dada por la presencia de factores limitantes como las defensinas, lactoferrina y lisozima en la saliva, el pH ácido gástrico, sales biliares, péptidos antimicrobianos, anticuerpos de mucosa, barreras epiteliales, la presencia de microbiota comensal y la respuesta inmune local (Scheftel, 2003). En el caso del ingreso de *B. canis* al humano por vía oral, este se podría producir cuando la persona, luego de manipular material contaminado con fluidos como abortos, loquios, placentas, neonatos, meconio, leche, saliva u orina, provenientes de perros infectados, que contienen altas cantidades de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), no se lava las manos adecuadamente, contaminando sus alimentos y posteriormente consumiéndolos (Greene & Carmichael, 2006). El inóculo necesario para infectar al humano no ha sido determinado, pero en caninos se sabe que por vía oral se necesita un inóculo de 10^6 UFC y que concentraciones de 10^3 a 10^6 organismos/ml se han detectado en orina de perros infectados. No se tiene información confirmada por cultivos sobre los inóculos en otro tipo de muestras de caninos (Greene & Carmichael, 2006).

Posterior a la ingestión, la bacteria debe resistir los cambios de pH que se producen en el tracto digestivo. Las bacterias ingeridas son capaces de tolerar el ambiente ácido del estómago y tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y colonizar al hospedero.

La mayoría de las especies de *Brucella* muestran una fuerte actividad ureasa que es responsable por la habilidad de *Brucella* de sobrevivir al tránsito estomacal y establecer una infección sistémica (Paulsen *et al.*, 2002), siendo esto probablemente lo que también ocurre en el caso de la infección a humanos por parte de *B. canis*.

Luego *B. canis* se disemina vía el sistema de vacuolas de la célula M por medio de las vacuolas del aparato de Golgi, pasan por vacuolas a la lámina propia e infectan los macrófagos de esta zona y se

diseminan por vía hematogena a otros órganos del sistema retículo endotelial, de allí a los órganos blancos de infección en el humano como hueso y articulaciones (Atluri *et al.*, 2011).

En células fagocíticas, *B. canis* podría ser internalizada por fagocitosis. En la invasión a macrófagos se pueden dar dos casos; el primero, que la bacteria no haya sido opsonizada porque es una infección nueva y, el segundo, que la bacteria que ingresa haya sido opsonizada por anticuerpos presentes de una infección previa (Rittig *et al.*, 2003).

La gran mayoría del inóculo bacteriano (80-90 %) es fagocitado, por lo cual las bacterias son rápidamente dirigidas a los lisosomas y la mayoría de las bacterias son eliminadas por la acción bactericida de los radicales libres de oxígeno, óxido nítrico y enzimas dentro del fagolisosoma (Rambow-Larsen *et al.*, 2009).

De *B. canis* se puede inferir a partir de los cuadros clínicos reportados en humanos que se disemina a los mismos órganos que las especies lisas de *Brucella*, pero no hay estudios al respecto. Por lo anterior, cabe la posibilidad de persistencia a largo plazo en el humano con formación de microgranulomas, similar a lo que se ha reportado en caninos, en donde la generación de una respuesta inflamatoria media tiene consecuencias importantes para la persistencia de *B. canis* en el tejido. La respuesta típica del tejido a la infección por *B. melitensis* y *B. abortus* es la inflamación granulomatosa, evidenciado por estudios histopatológicos de biopsias de ratones y humanos donde se encuentran pequeños granulomas en hígado, bazo, médula ósea y otros tejidos afectados por la bacteria. Este granuloma causado por *Brucella spp.* recibe el nombre de bruceloma, que se caracteriza por la presencia de necrosis con un halo periférico de macrófagos epitelioides (macrófagos con una cantidad aumentada de citoplasma), linfocitos, células plasmáticas e infiltrado polimorfonuclear en el área necrótica. Precisamente, los macrófagos epitelioides son un sitio conocido de persistencia bacteriana durante la infección.

1.8.1 Brucelosis en humanos

La patología en humanos suele cursar de forma asintomática; sin embargo las especies más involucradas en el desarrollo de la enfermedad a nivel mundial son *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (López Guarnizo, 2012; Díaz Aparicio, 2013). El periodo de incubación de la brucelosis oscila entre una semana y tres meses, dependiendo de la vía de infección, virulencia de la cepa infectante y tamaño del inóculo. Suele

ser más largo en las infecciones adquiridas por vía digestiva; este es un dato de interés a tener en cuenta al sospechar casos en viajeros que vuelven de zonas endémicas en las que han podido consumir productos lácteos sin higienizar (Young, 1995).

La brucelosis predomina en zonas rurales y las peculiaridades epidemiológicas locales influyen de forma notable en la edad y el sexo de los pacientes infectados. En términos generales, en las zonas de alta endemia la brucelosis afecta con más frecuencia a varones en edades medias de la vida.

Habitualmente, la brucelosis en seres humanos se comporta como un síndrome febril sin foco aparente. Su comienzo puede ser agudo o subagudo y la fiebre, habitualmente de carácter remitente, se precede de escalofríos y se acompaña de sudoración profusa, malestar general y artromialgias.

La duración media de los síntomas clínicos antes del diagnóstico es de 3 semanas, con un rango que oscila entre 10 y 45 días. Entre otros síntomas, se pueden mencionar hepatomegalia, esplenomegalia y un *rash* máculo-papuloso en tronco. No es infrecuente detectar bradicardia relativa. La presencia de adenopatías suele limitarse a los casos pediátricos. Habitualmente, los pacientes con brucelosis sin complicaciones focales no muestran signos de sepsis grave ni sensación de enfermedad grave (Colmenero *et al.*, 1986; Young, 1995; Ariza, 2002).

Como consecuencia de la diseminación hematológica que se produce en la fase inicial de la infección, entre un 20 a un 40 % de los pacientes con brucelosis desarrollan una forma focal a lo largo del curso de su enfermedad. El conocimiento de las formas focales es importante, ya que, por tener un curso más prolongado y un pronóstico más grave, se consideran verdaderas complicaciones de la enfermedad. Sólo deben considerarse verdaderas complicaciones focales aquellas en las que existen síntomas y hallazgos físicos persistentes en una localización anatómica concreta, junto a alteraciones de imagen o funcionales del órgano afectado, en el cuales posible constatar la presencia de *Brucella* (Colmenero *et al.*, 1996).

Dentro de las complicaciones focales de la brucelosis, las referidas al aparato osteoarticular son las más frecuentes, y las que afectan al aparato cardiovascular y al sistema nervioso central (SNC) son las más graves. Las complicaciones osteoarticulares representan entre un 60 y un 70 % del total de complicaciones focales de la brucelosis. En los adultos, el esqueleto axial es la zona afectada con más frecuencia, la osteomielitis vertebral y la inflamación sacroilíaca son las manifestaciones más frecuentes, y en menor frecuencia las artritis periféricas en forma de monoartritis u oligoartritis, las cuales prácticamente siempre son asimétricas (Colmenero *et al.*, 2007).

Entre las complicaciones genitourinarias, se encuentran las orquitis u orquiepididimitis, siendo las complicaciones genitourinarias más frecuentes y afectando aproximadamente a un 7 % de los varones con brucelosis (Erdem *et al.*, 2013). La evolución de la orquiepididimitis por *Brucella* suele ser buena con

tratamiento médico. No obstante, la demora en su diagnóstico o un tratamiento inadecuado puede desembocar en el desarrollo de un absceso testicular que requiera orquidectomía.

Aunque no es difícil aislar *Brucella* de la orina de pacientes con infección aguda, la afectación renal es poco frecuente. Sólo en raras ocasiones existe compromiso de la función renal. En estos casos, el mecanismo patogénico puede ser múltiple, causado por una nefritis intersticial por una lesión bacteriana directa, o bien afectación glomerular por depósito de inmunocomplejos. En este último caso, es frecuente la coexistencia de endocarditis (Manias *et al.*, 2013).

Las complicaciones neurológicas y cardiovasculares, aunque mucho menos frecuentes, tienen una especial importancia por su gravedad. La neurobrucelosis suele afectar al SNC y sus cubiertas, siendo la afectación aislada del sistema nervioso periférico excepcional. Algunos autores citan complicaciones neurológicas que representan entre un 2 a 5 % del total de formas focales de la brucelosis (Erdem *et al.*, 2013).

La presencia de hepatomegalia o discretas elevaciones séricas de las transaminasas son hallazgos muy frecuentes en la brucelosis y revierten rápida y completamente al comienzo de un tratamiento adecuado. Por este motivo, estos hallazgos no deben considerarse verdaderas complicaciones de la infección, concepto que debe reservarse para aquellos casos que tienen dolor permanente en hipocondrio derecho o ictericia, junto a severos aumentos de las enzimas hepáticas o absceso hepático. Definidos en estos términos, entre un 2-4 % de los pacientes con brucelosis tienen complicaciones hepáticas. Unas formas especialmente graves de ellas son los abscesos hepatoesplénicos crónicos, complicación que posee una entidad clínico-radiológica propia (Colmenero *et al.*, 2002).

1.9 Respuesta inmune

Las brucelas, patógenos intracelulares facultativos que resisten la muerte por neutrófilos, replican dentro de los macrófagos y en los fagocitos, manteniendo una larga interacción con las células anfitrionas. Las manifestaciones patológicas de la infección en animales difieren en muchos aspectos de la enfermedad inducida en la infección humana. En humanos, la infección por *Brucella* se caracteriza por fiebre ondulante que, generalmente, resulta en fijación de macrófagos infectados en localizaciones específicas dentro del cuerpo (bazo, cerebro, corazón, huesos) (Corbel, 1990). En mamíferos, la respuesta inmune es un sistema complejo que se desarrolla durante el tiempo con un escenario bien definido.

Los mecanismos de la inmunidad innata son los primeros en activarse ante la entrada de los agentes infecciosos. La inmunidad innata reduce el número inicial de bacterias y prepara el ambiente para la activación de los mecanismos de la inmunidad adaptativa. Las bacterias del género *Brucella* ingresan al

hospedador susceptible por las vías oral, nasal, conjuntival o genital. Luego de la infección, la bacteria es rápidamente fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) en los que sobrevive y se multiplica. Los PMNN facilitan la diseminación de las bacterias por dos mecanismos: uno, sirviendo de protección frente a las actividades bactericidas de anticuerpos (Ac) y complemento, y otro, transportándolas hacia los tejidos linfoides y los órganos del sistema reticuloendotelial donde la bacteria infecta a los macrófagos. La activación de los macrófagos involucra la fagocitosis de la bacteria, la producción de IFN- γ que estimula la proliferación de los linfocitos T (LT), y la internalización y procesamiento de los antígenos que son presentados en su superficie en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad, MHC1 o MHC2 dependiendo del origen y tipo de antígeno procesado. Los macrófagos y los neutrófilos poseen la capacidad de destruir los organismos de *Brucella* aunque no completamente. Los mecanismos activados para inhibir la multiplicación de bacteria o destruirla incluyen la estimulación del estallido respiratorio y la producción de radicales oxígeno libres en los PMNN dependiendo de la opsonización específica con Ac y/o inespecífica con C3b. Algunas citoquinas como el IFN- γ y TNF- α , y en menor medida las células naturales asesinas (NK) cumplen un rol importante en la estimulación de la fagocitosis.

El complemento tiene un papel muy importante en la defensa contra *Brucella* cuando ésta se encuentra en el compartimiento extracelular y en bajo número.

La respuesta adaptativa contra *Brucella* involucra mecanismos que actúan en diferentes etapas de la infección, como la generación de una respuesta humoral con producción de Ac, la activación de la función bactericida de los macrófagos por acción del IFN- γ producido por células T CD4+ y CD8+ y la lisis de células infectadas por LT CD8+ (Torioni, 2017).

Brucella spp., quizás en mayor grado que otros microorganismos intracelulares facultativos, inducen la producción de Ac. Estos pueden otorgar alguna protección en las etapas iniciales de la infección pero la fase bactericida coincide con el inicio de la inmunidad mediada por células (IMC).

La respuesta inmunitaria humoral humana frente a la Brucelosis se caracteriza por una producción inicial de IgM e IgG específicas frente a los antígenos brucelares, fundamentalmente frente al lipopolisacárido, que aumenta rápidamente después de producirse la infección (Orduña Domingo *et al.*, 2001). Los anticuerpos circulantes también desempeñan cierto papel en la inmunidad contra *Brucella*, pero existe poca correlación entre los títulos de anticuerpos y el grado de resistencia.

Después de la infección, aumentan primero las IgM (detectables en las primeras semanas postinfección) y empiezan a disminuir 3 meses después del inicio de la enfermedad; la IgG comienza a aumentar en la segunda semana de enfermedad (fase subaguda) y dura aumentada por lo menos por espacio de un año en pacientes no tratados; si hay tratamiento, disminuye hacia el sexto mes de iniciada la

enfermedad. Luego del aumento de la IgG (tanto IgG1 como IgG2), se observa también un aumento de la IgA (Nicolet, 1986). Si el aumento es persistente, puede deberse a la presencia de microorganismos intracelulares viables en tejido reticuloendotelial o focos de infección (Castillo *et al.*, 2003).

En los pacientes con una Brucelosis aguda y en los que el tratamiento ha sido eficaz, los títulos de IgM declinan rápidamente en los meses siguientes; a los 12 meses menos del 20 % de los pacientes presentan este tipo de anticuerpos. Por el contrario, los títulos de anticuerpos de clase IgG, aparte de alcanzar niveles más altos que los de clase IgM, disminuyen más lentamente, de forma que pueden ser detectados 2 años después de finalizado el tratamiento en más del 50 % de los pacientes. Esto quiere decir que la curación clínica no mantiene una correlación estricta con la curación serológica, ya que es frecuente que los títulos de anticuerpos permanezcan elevados en pacientes clínicamente curados.

En los pacientes en los que fracasa el tratamiento y en aquellos en los que se produce una recidiva, los anticuerpos de clase IgG se mantienen elevados o incluso con mucha frecuencia pueden experimentar un aumento en el título (Orduña Domingo *et al.*, 2001c).

En la inmunidad mediada por células (IMC) la participación de los LT en la respuesta inmunitaria a *Brucella* ha sido estudiada principalmente en ratones. En infecciones por *Brucella* con LPS liso, los LT parecen pesar más que los Ac en la protección. Estudios posteriores realizados indican que ambas poblaciones de LT (CD4+ y CD8+) participan en la protección *B. abortus*.

La resistencia a los patógenos intracelulares, como en el caso de *B. abortus* depende de la activación de la IMC, siendo el principal activador de los macrófagos el IFN- γ secretado por los LT CD4+ y CD8+. Asimismo, se ha demostrado que las bacterias vivas son capaces de inducir a las células Th1 a producir IFN- γ e IL-2, favoreciendo de este modo la síntesis de IgG2. La inyección de extractos de *Brucella* ricos en proteínas, o la bacteria muerta, estimulan la población Th2 con producción de IL-4 e IgG1.

1.10 Diagnóstico

1.10.1. Diagnóstico en el perro

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis canina son la técnica de seroaglutinación con antígeno rugoso (RSAT) y la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID). Ambas técnicas detectan la presencia de anticuerpos contra antígenos de superficie de brucelas rugosas, especialmente el LPS rugoso (rLPS), pero presentan falsos negativos (debido a la baja sensibilidad) y resultados falsos positivos (baja especificidad) por la detección de anticuerpos generados frente a LPS de enterobacterias (Cortina *et al.*, 2017).

Debido a esto, se han modificado técnicas, utilizando un antígeno M- en el RSAT, un AGID desarrollado a partir de antígenos proteínicos citoplasmáticos y pruebas de ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFI). El hemocultivo sigue siendo el método recomendado antes de declarar al animal infectado, pero como la bacteriemia puede ser intermitente un cultivo negativo no puede usarse como criterio para excluir una infección por *Brucella canis*.

El uso de un antígeno proveniente de una variante M- de *Brucella canis* en reemplazo del antígeno de *Brucella ovis* reduce la tasa de falsos positivos a un 10 %. El antígeno M- teñido con Rosa de Bengala es levemente más sensible que los antígenos comerciales de *Brucella ovis*. En ambos casos, el suero problema debe tratarse primero durante 1 minuto con 2 mercaptoetanol.

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 negativo.

El ELISA indirecto propuesto como diagnóstico se aconseja para estudiar los sueros positivos a RSAT, como una prueba complementaria después de ésta, aumentando la especificidad. Detecta IgA e IgG, permitiendo evaluar el estado clínico del animal. Otros autores citan el uso de ELISA indirecto utilizando como antígeno un lipopolisacárido rugoso (RLPS) obtenido de un cultivo de *Brucella canis*, lográndose en este caso una especificidad del 98,8 % y sensibilidad del 95,8 % (Baruta *et al*, 2006).

1.10.2. Diagnóstico de brucelosis humana

Las técnicas serológicas más utilizadas para detectar los anticuerpos de *B. canis* en humanos son las pruebas de aglutinación (Lucero *et al.*, 2008). Se informa también sobre el uso potencial de este iELISA para el diagnóstico de la brucelosis.

A) Pruebas serológicas que detectan anticuerpos anti R-*Brucella* (*B. canis*)

• Técnica de microaglutinación en portaobjeto (RSAT)

Es una prueba de tamizaje, rápida, práctica y económica que fue descrita para el diagnóstico de brucelosis canina y es utilizada en el diagnóstico de brucelosis causada por *B. canis* en humanos. Esta técnica es cualitativa y se interpreta como positiva o negativa.

- **ELISA indirecto (ELISAI)**

Es una prueba muy sensible y específica utilizada como confirmatoria para el diagnóstico de brucelosis humana en casos de infección por *B. canis*. Tiene una sensibilidad y especificidad del 100 %.

B) Diagnóstico bacteriológico

Aunque la prueba más específica para el diagnóstico de brucelosis es el aislamiento de *Brucella* spp., su eficacia es baja y un resultado negativo no puede descartar la enfermedad, sobre todo en las formas crónicas en las que los cultivos negativos son frecuentes.

Las cepas se pueden recuperar a partir de sangre, médula, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, biopsias u otros materiales. La toma de la muestra se debe hacer lo antes posible para que el tratamiento con antibióticos no interfiera en el resultado.

El hemograma convencional es poco específico en la infección por *Brucella*. Habitualmente, los pacientes muestran una cifra normal de leucocitos con linfocitosis relativa, una leve anemia normocítica y normocrómica, cifras normales o levemente bajas de plaquetas, ascensos moderados de amino-transferasas y de adenosindeaminasa. Los extendidos de sangre periférica pueden mostrar linfocitos activados, hecho que podría desviar la orientación diagnóstica hacia una infección de etiología vírica.

La inespecificidad y heterogeneidad del cuadro clínico, unidas a esta poca expresividad del hemograma convencional, obliga siempre, ante la sospecha de brucelosis a intentar confirmar el diagnóstico microbiológicamente.

Como en otras infecciones bacterianas, el diagnóstico microbiológico de la brucelosis puede ser directo, mediante el aislamiento de *Brucella* en cualquier fluido o muestra tisular, o indirecto, mediante la demostración de la presencia en suero de anticuerpos a títulos significativos o seroconversión.

El diagnóstico inequívoco requiere el aislamiento de *Brucella* spp. La muestra más rentable es el hemocultivo, el cual debe realizarse siempre ante la sospecha clínico-epidemiológica de brucelosis, incluso en pacientes apiréticos. En las formas agudas sin focalidad producidas por *B. melitensis*, la rentabilidad del hemocultivo es muy alta, alcanzando un 70-80 % de los casos. Esta sensibilidad se reduce en casos de larga

evolución, en pacientes con complicaciones focales y en los casos producidos por *B. abortus* o *B. suis*, eventualidad esta última muy poco frecuente en nuestro país.

Aunque *Brucella spp.* es un microorganismo exigente cuyo aislamiento puede requerir una incubación prolongada, los métodos semiautomáticos actuales de procesamiento de hemocultivo (BACTEC 9240, FX o Bac/Alert) han acortado sensiblemente el tiempo de detección. Actualmente, estos métodos permiten detectar en más del 70 % de los casos la presencia de *Brucella* en sangre con el protocolo habitual de procesamiento de hemocultivos que, en la mayoría de los hospitales, es de 5-7 días. En cualquier caso, por razones de bioseguridad y para lograr el mayor rendimiento, es importante notificar al laboratorio de microbiología la sospecha de brucelosis para que mantengan en estos casos, si es necesario, una incubación más prolongada.

En los últimos años, nuestro grupo y también otros autores, se han desarrollado diferentes métodos moleculares, fundamentalmente de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Brucella* en sangre y otras muestras clínicas.

Esta tecnología es más rápida y sensible que el hemocultivo y evita además el riesgo de la manipulación directa de *Brucella* por el personal de laboratorio. Los métodos de PCR también se han mostrado más sensibles que los cultivos convencionales en el diagnóstico directo de la mayoría de las complicaciones focales y las frecuentes recidivas de la enfermedad. A pesar de estas ventajas, la aplicación de los métodos moleculares para el diagnóstico de la brucelosis en la práctica clínica actual sigue siendo artesanal y muy limitada, debido a la falta de pruebas comerciales de eficacia contrastada.

A pesar de la eficacia de los hemocultivos, al ser la brucelosis una infección de adquisición comunitaria, de predominio en ámbito rural y mayoritariamente diagnosticada en países con limitados recursos sanitarios, el diagnóstico de esta enfermedad sigue basándose fundamentalmente en la demostración de anticuerpos específicos por medio de métodos serológicos.

Existen múltiples pruebas serológicas aplicables al diagnóstico de la brucelosis en seres humanos: prueba de rosa de Bengala (RBT), inmunocromatografía, seroaglutinación (SAT), prueba de Coombs antibrucella, aglutinación-inmunocaptura (BrucellacaptR, Vircell) y ELISA, todas ellas con buena sensibilidad pero limitada especificidad en áreas de alta endemia, personas profesionalmente expuestas y aquellas con antecedentes de brucelosis reciente. A lo cual hay que añadir la posibilidad de reacciones cruzadas con algunas bacterias como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* O:30 y *Vibrio cholera*.

La estrategia más usada actualmente en el diagnóstico serológico de la brucelosis consiste en la combinación de una prueba rápida de detección, como RBT, y una de confirmación, SAT y BrucellacaptR.

La prueba de *screening* RBT consiste en una aglutinación rápida en porta que usa como antígeno una suspensión de *B. abortus* en un tampón ácido. Esta prueba es capaz de detectar anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes y no se ve afectada por el fenómeno de prozona.

Si exceptuamos los casos de muy corta evolución en los que aún podría no haberse generado una respuesta inmune suficiente, la sensibilidad del RBT es superior al 95 %, independientemente del estadio y forma clínica de la enfermedad.

Además de su simplicidad y bajo precio, RBT puede ser usada cualitativa y cuantitativamente diluyendo la muestra de forma progresiva (Díaz *et al.*, 2015).

La SAT es la prueba serológica más clásica. Se realiza mediante diluciones múltiples en tubo y, aunque sólo es capaz de detectar anticuerpos aglutinantes, su eficacia es alta cuando se realiza con un buen antígeno estandarizado. Existe una buena correlación entre los títulos de la SAT y el RBT BrucellacaptR es una prueba de inmunocaptura que ha mostrado una excelente correlación con la prueba de Coombs antibrucella, siendo por el contrario mucho más fácil de realizar e interpretar que esta última, a la cual ha desplazado de la mayoría de los laboratorios clínicos. Existen datos que permiten afirmar que unos títulos de RBT $\geq 1/4$ o SAT $\geq 1/160$ o Brucella capt R $\geq 1/320$ son diagnósticos de brucelosis activa en cualquier paciente con un cuadro clínico compatible.

No obstante, en zonas de alta endemia, en pacientes profesionalmente expuestos, con antecedentes de brucelosis reciente o complicaciones focales, es conveniente el uso de más de una prueba en paralelo.

1.11. Tratamiento

In vitro, las distintas especies del género *Brucella* son muy sensibles a la mayoría de los antibióticos. Sin embargo, no existe una buena correlación entre el resultado de los test de sensibilidad y el resultado terapéutico. Esto explica que en la práctica clínica habitual, cuando el laboratorio de microbiología aísla *Brucella* no se informe de su sensibilidad.

La razón de esta discrepancia radica en el hecho de que *Brucella* es un patógeno intracelular facultativo que, al localizarse y permanecer activo dentro del fagolisosoma, resiste la acción de muchos antimicrobianos.

Los antimicrobianos más útiles en el tratamiento de la brucelosis son las tetraciclinas, aminoglucósidos y rifampicina. Entre las tetraciclinas, doxiciclina es la molécula preferente y estreptomycin es el aminoglucósido con el que se ha acumulado más experiencia, si bien existen datos que permiten afirmar que gentamicina es igualmente activo y susceptible de ser usado fácilmente por vía

intravenosa en casos graves (Hasanjani *et al.*, 2006). Trimetoprim-sulfametoxazol y las quinolonas son antimicrobianos alternativos que pueden ser usados para el tratamiento de casos muy concretos.

La alternativa terapéutica al tratamiento con doxiciclina más estreptomina es la combinación de doxiciclina 100 mg por vía oral cada 12 horas más rifampicina 600-900 mg por vía oral cada 24 horas, ambos durante 45 días. Todos los demás esquemas terapéuticos propuestos hasta ahora para el tratamiento de la brucelosis no complicada deben ser considerados de segunda línea (Ariza *et al.*, 2007).

A pesar de la ventaja que supone su la administración oral, la eficacia de la pauta doxiciclina más rifampicina es algo inferior a doxiciclina más estreptomina. En la mayoría de los ensayos clínicos realizados, la eficacia terapéutica de doxiciclina más rifampicina se sitúa entre el 85 y 92 %.

Estos resultados podrían guardar relación con el descenso de los niveles plasmáticos de doxiciclina inducidos por rifampicina en sujetos acetiladores rápidos (Colmenero *et al.*, 1994).

Salvo alguna excepción concreta, las formas focales de la brucelosis tienen peor pronóstico, razón por la cual se consideran complicaciones de la enfermedad. Incluso con un tratamiento correcto, su tasa de fracasos terapéuticos y recaídas es muy superior al de las formas agudas sin focalidad. Además, los casos de afectación del SNC, osteomielitis vertebral y endocarditis pueden deparar severas secuelas funcionales y una mortalidad no despreciable. Por este motivo, el diagnóstico y tratamiento de las formas focales trasciende el ámbito de la Atención Primaria y debe ser responsabilidad del ámbito hospitalario.

El tratamiento de las complicaciones del SNC merece una consideración especial, ya que ni doxiciclina ni los aminoglucósidos alcanzan buenos niveles, ya que atraviesan con dificultad la barrera hematoencefálica. Por este motivo, en las complicaciones del SNC, aunque no existe un consenso global al respecto, se recomienda un tratamiento triple con rifampicina más doxiciclina y gentamicina o trimetoprim sulfametoxazol. Excepto el aminoglucósido, el resto del tratamiento se debe prolongar en todos los casos durante tres meses o incluso más tiempo si persisten las alteraciones biológicas del LCR (Ariza *et al.*, 2007).

1.12. Profilaxis y control

Es fundamental comprender que sin brucelosis animal no existe enfermedad en el hombre, por ello se debe poner énfasis en la implementación y difusión de medidas de control tendientes a erradicar esta enfermedad en los animales.

La población en general está protegida mediante la obligatoriedad de pasteurización de la leche y sus derivados, aunque no existe un control estricto en la venta de productos lácteos caseros de tipo artesanal. Son muy importantes las acciones de Educación para la Salud dirigidas a la población en general donde se enfatice los riesgos del consumo de productos elaborados con leche sin pasteurizar de vacas, ovejas y cabras.

Con relación al control de la infección de los animales:

Para evitar la aparición de la enfermedad y el contagio en animales pueden realizarse diversas acciones como:

- Diagnóstico precoz de la enfermedad.
- Inmunización y planes de control de los animales infectados:

- Bovinos: Inmunización / Vacunación con cepa 19 (*B. abortus*) de las terneras entre los 3 y 8 meses de edad (los machos no se vacunan).

- Caprinos: Inmunización / Vacunación de todas las categorías de cabras (machos y hembras) excepto los cabritos con destino a faena inmediata y ovinos (machos y hembras) que convivan con ellas.

- Recordar que los perros y cerdos no se vacunan.

- Se debe mantener la cuarentena de animales según especie y situación.
- Se debe enviar a faena los animales positivos (bovinos, caprinos, cerdos, ovinos).
- Realizar la castración de perros positivos.
- No alimentar a los perros y otros animales con restos de abortos y animales muertos para interrumpir la cadena de transmisión.

Con relación a la prevención de la exposición

- Informar a la población general acerca del riesgo de manipular productos de animales infectados

Una población bien informada acerca de los factores de riesgo y medidas preventivas es fundamental para evitar futuros contagios.

- La vacunación en los animales disminuye de manera drástica la aparición de casos humanos.
- Mantener una adecuada protección individual con equipos de protección durante actividades como asistir partos, realizar tactos o manipular tejidos animales, utilizando guantes que cubran todo el antebrazo, botas altas de goma, delantales y mascarillas; recordando que el material debe ser fácil de limpiar y desinfectar o en su defecto desechable.

- Controlar el estado sanitario de todos los animales que ingresen al hogar o establecimiento.
- Adherirse a los planes de vacunación del ganado bovino y caprino según región.

Con relación a la seguridad de los alimentos:

Educar a la población general acerca de la importancia de:

- Evitar la ingestión de leche y derivados lácteos no pasteurizados. En caso de que se consuman productos caseros no sometidos a un proceso industrial, es recomendable hervir la leche (5 minutos desde que rompe el hervor) antes de beberla o elaborar subproductos.
 - Evitar la ingestión de carne, vísceras, sangre o productos similares mal cocidos.
 - La pasteurización de la leche y de los productos lácteos para consumo humano es especialmente importante para evitar la enfermedad.

En canes no se cuenta con vacunas y los resultados de estudios experimentales son poco satisfactorios. Las medidas preventivas son importantes, sobre todo en criaderos grandes o cuando se tiene un gran número de perros, pero no hay medidas obligatorias y la brucelosis canina no es una enfermedad notificable. Deberá informarse a los dueños de perros sobre los peligros potenciales para la salud al mantener mascotas infectadas por *B. canis* (Carmichael y Green, 1996).

OBJETIVOS

“Nada es más creativo..., o destructivo..., que una mente brillante con un propósito.” Dan Brown

OBJETIVOS

Objetivo general

- Contribuir al estudio serológico de corte transversal para determinar el riesgo epidemiológico de Brucelosis en estudiantes de la UNRC durante el año 2017.

Objetivos específicos

- Determinar la proporción de estudiantes de la UNRC sero-reaccionantes a distintas cepas (lisas y rugosas) de *Brucella*.

- Identificar los factores ecológicos y epidemiológicos que contribuirían a la presentación de esta zoonosis.

- Promover la difusión y uso de la información epidemiológica para prevenir la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

“Nada tiene tanto poder para ampliar la mente como la capacidad de investigar de forma sistemática y real todo lo que es susceptible de observación en la vida”. Marco Aurelio

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y tamaño de muestra:

El estudio fue por conveniencia, no probabilístico y consistió, como criterio de inclusión, en el muestreo de los estudiantes que libremente expresaron su voluntad de ser analizados en ocasión de sus exámenes médicos anuales del año 2017. El tamaño de la muestra alcanzó un total de 58 alumnos (N=58).

Consentimiento informado:

En todos los casos, se informó por escrito al estudiante sobre los objetivos del estudio a realizar, los que firmaron libremente su conformidad para la derivación del suero al laboratorio de Patología Animal de la FAV para su posterior análisis serológico.

Encuesta:

Los estudiantes contestaron por escrito una encuesta estructurada, con preguntas cerradas y abiertas, relacionadas con antecedentes de salud y de su entorno ambiental. La misma se realizó inmediatamente antes de la extracción de sangre que los alumnos deben realizarse anualmente en la Dirección de Salud de la UNRC. Los datos fueron procesados mediante el Software EpiDat ver 3.1.

Recolección de muestras:

La extracción de sangre se realizó por personal bioquímico de la Dirección de Salud de la UNRC. Se obtuvieron 5 ml de sangre periférica venosa en condiciones de asepsia con jeringa estéril desechable. Una vez organizado el coágulo, se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 15 minutos para facilitar la separación del suero. Los sueros fueron enviados diariamente al laboratorio de Patología Animal y mantenidos a -20 °C hasta su procesamiento. La muestra se identificó con el DNI del alumno y la fecha de extracción.

Técnicas serológicas:

Se utilizaron antígenos de referencia adquiridos en el SENASA para la detección de anticuerpos dirigidos contra cepas lisas (BPA) y rugosas (RSAT) de *Brucella*. Cabe aclarar que las técnicas serológicas

requieren nivel 1 de bioseguridad por ser antígenos inactivados y el mismo estaba garantizado en el Departamento de Patología Animal.

Las técnicas serológicas para Brucelosis se realizaron según las normas internacionales recomendadas. Por tratarse de antígenos inactivados, no implicó riesgo para el operador.

Para detectar anticuerpos anti especies lisas (S) de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) se realizó la prueba de aglutinación con antígeno tamponado (BPA) descrita por Angus y Barton. Es la prueba tamiz oficialmente aceptada en la Argentina para el diagnóstico de brucelosis bovina y fue realizada de acuerdo a procedimientos estandarizados, con antígeno preparado en el laboratorio de Brucelosis de SENASA.

Para detectar anticuerpos anti especies rugosas (R) de *Brucella* (*B. canis* y *B. ovis*) se efectuaron las siguientes pruebas:

- Inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Se realizó de acuerdo a métodos ya descrito, utilizando un antígeno, lote 1-05, provisto por SENASA, Argentina, preparado con *B. ovis*. En cada placa de IDGA se incluyó un suero control positivo, lote 4-04, también provisto por SENASA, Argentina.

- Prueba de aglutinación rápida en portaobjeto (RSAT). Se utiliza como tamiz y se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Carmichael *et al.*, incluyendo en cada portaobjeto un suero control positivo. El antígeno fue preparado en el laboratorio de Brucelosis de SENASA, utilizando la cepa *B. canis* M-.

RESULTADOS

*“Nunca se alcanza la verdad total, ni nunca se está
totalmente alejado de ella.” Aristóteles*

RESULTADOS

El presente estudio se realizó sobre un total de 58 (N=58) alumnos de la Universidad Nacional de Río Cuarto que participaron voluntariamente del ensayo luego de acudir a la Dirección de Salud para realizar sus exámenes médicos anuales obligatorios. Previamente se les entregó un consentimiento informado junto a una encuesta donde respondieron preguntas sobre datos epidemiológicos y conocimiento de la enfermedad.

El total de los individuos encuestados tiene domicilio actual en la ciudad de Río Cuarto, pero el lugar de procedencia, donde tienen domicilio fijo se distribuye en la Ciudad de Río Cuarto, pueblos cercanos a la ciudad de Río Cuarto y el resto otras provincias. Tal como se muestra en el Gráfico N° 1. A su vez, el rango de edades de las personas participantes es de 20 a 28 años.

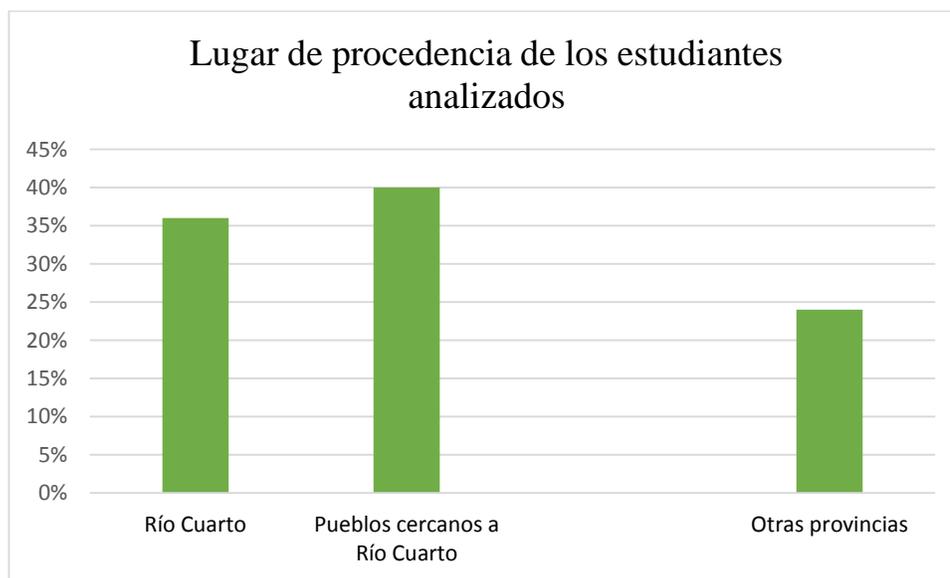


Gráfico 1. Distribución según el lugar de procedencia de la población en estudio.

El Gráfico N°2 ilustra la distribución por sexo de la población bajo estudio en la cual la mayoría de los estudiantes que respondieron a la encuesta fueron del sexo femenino.

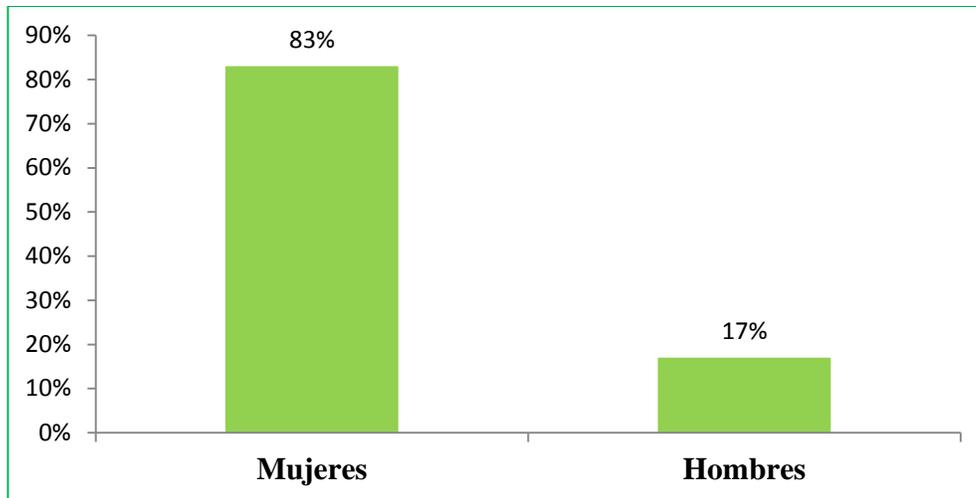


Gráfico 2. Distribución porcentual por sexo de los estudiantes de la Universidad Nacional de Río Cuarto participantes del estudio.

De un total de 58 sueros humanos procesados, 1 resultó seropositivo a la técnica de RSAT, demostrando la presencia de anticuerpos contra *B. canis* (1,72%). Sin embargo, no pudo confirmarse la presencia de la bacteria en circulación sanguínea, debido a que el intento de aislamiento a partir de sangre entera, resultó negativo.

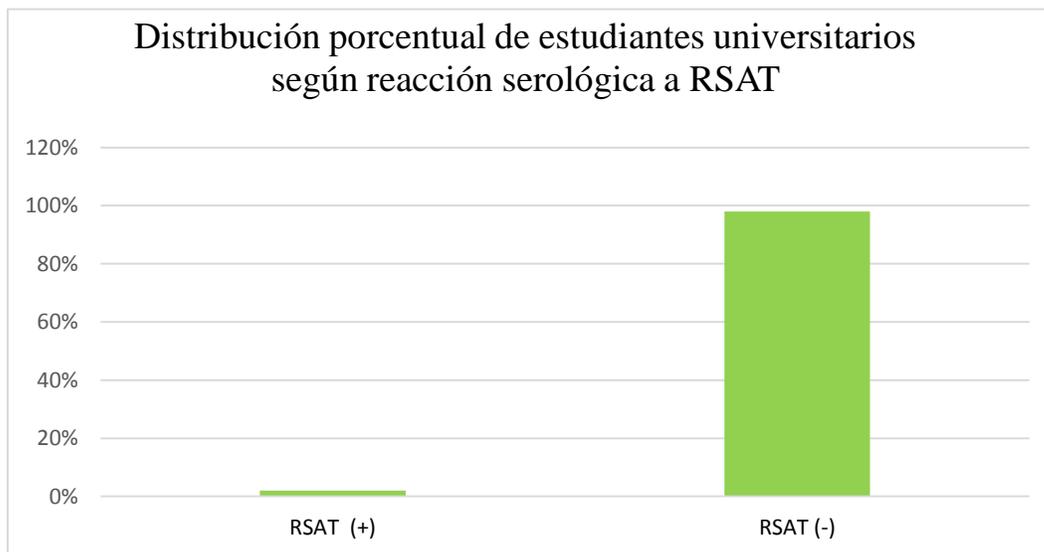


Gráfico 3. Distribución porcentual según reacción serológica a la técnica de RSAT en estudiantes de la Universidad Nacional de Río Cuarto participantes del estudio.

En cuanto a la técnica de BPA para la detección de reaccionantes a cepas lisas de *Brucella*, la totalidad de los sueros bajo estudio resultaron negativos (Gráfico N°2)

Junto a la firma del consentimiento informado, los estudiantes respondieron encuestas auto-administradas en el momento previo a la extracción de sangre. Las preguntas indagaban sobre variables de riesgo que condicionan la presencia de Brucelosis. El gráfico N° 4 muestra las variables analizadas en las encuestas. El gráfico N° 4 muestra las variables analizadas en las encuestas.

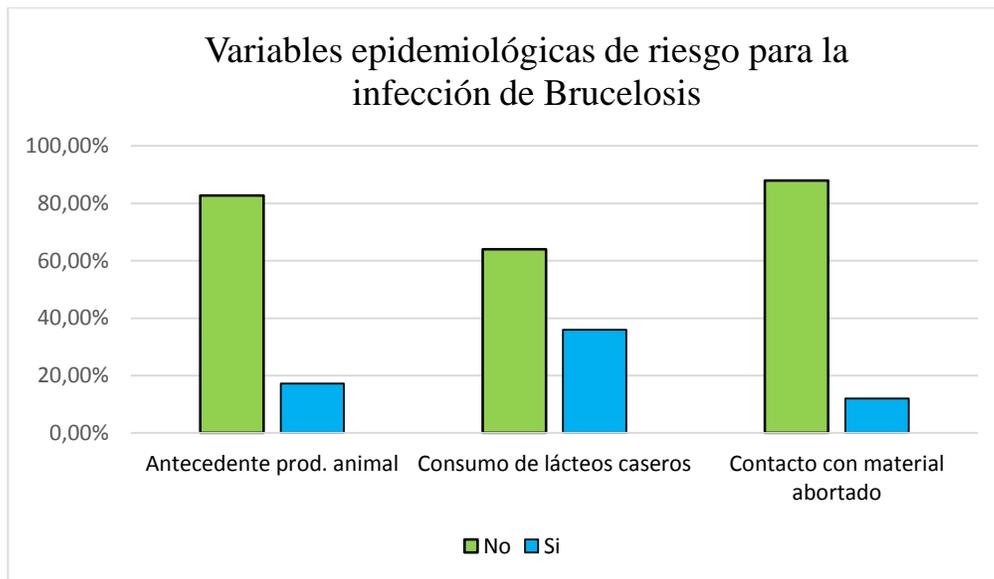


Gráfico 4. Antecedentes epidemiológicos para Brucelosis obtenidos a partir de las encuestas que respondieron los estudiantes muestreados

Con respecto a los antecedentes epidemiológicos, se consideraron cada una de las variables como posibles factores de riesgo. Los resultados obtenidos indican que un porcentaje bajo de 17,24% (10/58) de los estudiantes provenían de colegios agrotécnicos y, además manifestaron haber tenido antecedentes laborales en producción animal vinculada a producción bovina de carne, leche o producción de cerdos. Teniendo en cuenta esto, un porcentaje bajo (12 %) respondió haber tenido contacto con materiales abortados, que es uno de los principales factores de riesgo para la transmisión de la Brucelosis al hombre.

Otra variable de riesgo condicionante para la presencia de la enfermedad es el consumo de productos lácteos sin pasteurizar, frente a lo cual el 36 % de los estudiantes respondieron afirmativamente en la encuesta.

En cuanto a la tenencia de perros, un alto porcentaje de estudiantes, el 87,93 % (51/58) declaró poseer caninos en su lugar de origen, mientras que sólo el 10,34 % (6/58) poseían caninos en sus lugares de residencia universitaria.

Respecto al nivel de conocimiento sobre Brucelosis, cuando se indagó sobre su agente causal, formas de transmisión y animales reservorios, así como las principales medidas de prevención frente al riesgo, el 84,48 % (49/58) manifestó un nulo o escaso nivel de información. Esta información se ve reflejada en el gráfico N°5. Sólo un 16 % tenía conocimiento sobre la brucelosis y, a su vez, cuando se investigó sobre la fuente de información, 7 alumnos manifestaron recibir la información de la escuela a la que asistieron y sólo 2 de la universidad.

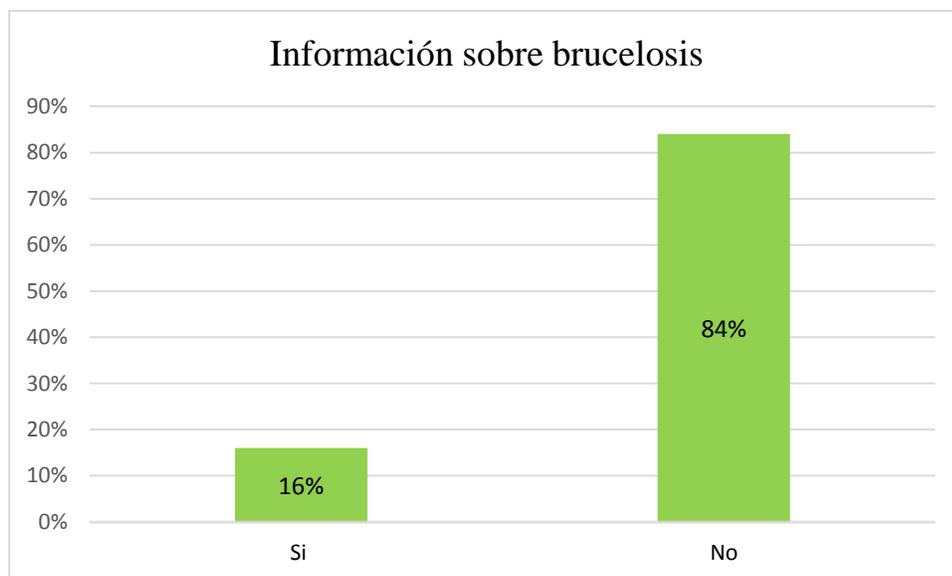


Gráfico 5. Distribución porcentual sobre la variable Información sobre brucelosis, según las encuestas contestadas.

Para cumplir con el último objetivo de este estudio de generar un aporte al conocimiento de Brucelosis, se utilizó un afiche ilustrativo (ANEXO) con información sobre características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad. Para crear una contribución a la concientización y prevención de esta importante zoonosis, el mismo será expuesto en las clínicas veterinarias y también en el Centro de Salud de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

DISCUSIÓN

“La discusión fortalece la agudeza.” Cicerón

DISCUSIÓN

La brucelosis es una enfermedad de gran importancia zoonótica en la actualidad, se entiende que el mayor riesgo de contraer esta infección y poder desarrollar la enfermedad recae sobre el personal que tenga contacto directo con animales o con productos de origen animal, entre estos encontramos personal veterinario, personal de mataderos y frigoríficos, junto con ganaderos y porcicultores, sumado a esto estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria (Moscoso *et al.*, 2017). Sin embargo, en este estudio se pudo notar mediante la encuesta otorgada que la exposición a factores de riesgo como el contacto con animales infectados no solo se limita a los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria si no que incluye a la totalidad de los alumnos que concurren a la Universidad.

Existen varias formas de adquirir la infección, en los países endémicos suele referirse principalmente al consumo de leche o sus derivados y en los no endémicos al contacto con fluidos de animales y aerosoles (Kose *et al.*, 2006). Los primeros deberían tenerse en cuenta, ya que los análisis arrojaron resultados considerables. Esto podría coincidir con el folleto publicado por el Ministerio de la Nación en 2013, donde afirma que los casos que se producen en el medio urbano reconocen en general este origen. La población en general está protegida mediante la obligatoriedad de pasteurización de la leche y sus derivados, aunque no existe un control estricto en la venta de productos lácteos caseros de tipo artesanal. Son muy importantes las acciones de Educación para la Salud dirigidas a la población en general donde se enfatice los riesgos del consumo de productos elaborados con leche sin pasteurizar de vacas, ovejas y cabras.

A su vez, el Ministerio de la Nación afirma que el principal mecanismo de transmisión de la enfermedad lo constituye el contacto con animales infectados o sus productos. Este mecanismo es el más frecuente en el medio rural y en relación con actividades agropecuarias y ganaderas, pudiendo llegar a ser el responsable del 60-70% de los casos registrados. En este estudio no se observó asociación entre la actividad agropecuaria y la prueba de BPA, esto es podría deberse a que un bajo porcentaje de estudiantes manifestaron haber tenido antecedentes de actividades vinculadas con animales de producción.

Según Colmenero *et al.*, 1996 la brucelosis se comporta como un síndrome febril sin foco aparente. Su comienzo suele ser agudo o subagudo y la fiebre habitualmente de carácter remitente. La duración media de los signos clínicos antes del diagnóstico es de tres semanas, con un rango que oscila entre 10 y 45 días. Esto es coincidente con un reporte de caso de Jaramillo *et al.*, 2014 sobre una coinfección de brucelosis y leptospirosis.

Como indica Blasco en 2001, los grupos de mayor riesgo de infección incluyen en su mayoría a personas del sexo masculino. Por esto suele indicarse que si bien son susceptibles personas de ambos sexos puede existir cierta tendencia a que la enfermedad se presente en mayor medida en el sexo masculino. Y a su vez, esto coincide con lo que sostiene Colmenero et al, Young, 1995 y Ariza, 2002 que la brucelosis predomina en zonas rurales y con peculiaridades epidemiológicas locales que influyen de forma notable la edad y sexo de los pacientes infectados. En términos generales, en las zonas de alta endemia la brucelosis afecta con más frecuencia a varones de edades medias de vida. Los resultados observados no permiten asociar sexo ni actividad agropecuaria debido a que todas las muestras resultaron negativas a BPA. Pero discrepa con lo propuesto por Lugo *et al.*, 2010, donde encontró que el género femenino presento mayor seropositividad, por lo que se considera que esta variable no depende del genero si no de la exposición en mayor o menor medida a los factores de riesgo que existen. En nuestro trabajo solo se encontró 1 resultado seropositivo correspondiente a una persona del sexo masculino por lo que pondría en duda lo propuesto por dicho autor.

En un trabajo publicado por Trabattoni (Trabattoni *et al.*, 2002), realizado en estudiantes de la Facultad de Esperanza donde se investigó la prevalencia de *B. canis* utilizando la prueba de RSAT el total de sueros evaluados resultaron negativos; mientras que en nuestra universidad Martin *et al.* 2015 determinó un 24% (176/735) de sueros positivos en alumnos de la carrera de Medicina Veterinaria. A través del presente estudio se pudo establecer una prevalencia de 1,72 %; cabe destacar que no se puede establecer relación con los trabajos anteriores ya que el muestreo no fue representativo de la cantidad de alumnos que acuden al centro de salud por año. Los resultados positivos son para tener en cuenta, ya que podría revelar que el riesgo de infección con *Brucella canis*, puede ser mayor que con brucelas lisas, o bien, que la falta de información sobre la enfermedad sea un punto importante a la hora de poder prevenir o disminuir el riesgo de contraer brucelosis en una población.

Con respecto a la tenencia de animales, la mayoría manifestó poseer mascotas en su domicilio de origen, pero una cantidad muy baja (10,34%) de alumnos aclaró que poseía animales en el domicilio de residencia universitaria, y en general, poseían escaso o nulo conocimiento sobre la enfermedad, su mecanismo de transmisión, a qué animales afecta y su potencial zoonótico. En este trabajo no se encontró relación entre la seropositividad y tenencia de caninos, este hecho puede deberse a la presencia de solo una persona que reaccionó positivo frente a la técnica de RSAT.

Un porcentaje muy bajo de estudiantes 17,24% (10/58) provenían de colegios agrotécnicos y también una minoría manifestó haber tenido antecedentes laborales en producción animal (producción bovina de carne, leche y producción de cerdos), esto explicaría la seronegatividad a cepas lisas de *Brucella*, en este punto las pruebas diagnósticas de tamizaje para brucelosis indica que no se ha tenido contagio con

el microorganismo o bien puede ser que el proceso de infección se encuentra en donde no hay todavía producción de anticuerpos (período de ventana). De manera similar como lo propone Moscoso *et al.* (2017), los estudiantes de medicina veterinaria son catalogados como personal de alto riesgo frente a diversas zoonosis, sin embargo, un resultado 100% negativo en su población bajo estudio es llamativo y abre la discusión sobre si se pueden considerar personal de alto riesgo, incluyendo además varios factores como la educación en salud, la Bioseguridad, las buenas prácticas en trabajo de campo.

Por otro lado, el diagnóstico de laboratorio de *Brucella canis* incluye las pruebas de aglutinación rápida en placa (ARP), aglutinación rápida en tubo (RSAT) e inmunodifusión en gel de agar (AGID). Estas tres pruebas tienen una cierta falta de especificidad dado que el Ag de superficie de brucelas rugosas reacciona en forma cruzada con los anticuerpos producidos por otras especies de bacterias no patógenas (Shin y Carmichael, 1999). Debido a esto se han refinado técnicas, implementándose una prueba RSAT utilizando un antígeno M-, un AGID que utiliza antígenos proteínicos citoplasmáticos y pruebas de ELISA e IFI. Según Colmenero *et al.*, 2008; Sagi *et al.*, 2017 el diagnóstico inequívoco requiere el aislamiento de *Brucella spp.* La muestra más rentable es el hemocultivo el cual debe realizarse siempre ante la sospecha clínico-epidemiológica de brucelosis, pero Ardoino *et al.*, 2006 sostienen que la bacteriemia puede ser intermitente y un cultivo negativo no puede usarse como criterio para excluir la infección por *Brucella canis*. A pesar de la eficacia de esta técnica, Ariza *et al.*, 1992 sostienen que al ser la brucelosis una infección de adquisición comunitaria, de predominio en ámbito rural y mayoritariamente diagnosticada en países con limitados recursos sanitarios, el diagnóstico de esta enfermedad sigue basándose en la demostración por medio de métodos serológicos, hay una gran variedad, todas ellas con buena sensibilidad pero limitada especificidad. A lo cual se añade la posibilidad de reacciones cruzadas con bacterias como *Yersinia enterocolitica* O: 9, *Escherichia coli* O: 157, *Francisella tularensis*, *Salmonella* urbana O: 30 y *Vibrio cholera*. Si bien Díaz *et al.*, 2015 describe en su trabajo que la estrategia más usada actualmente en el diagnóstico serológico de la brucelosis producida por *B. abortus* consiste en la combinación de una prueba rápida de detección como el Rosa de Bengala (RBT) y una de confirmación, SAT y BrucellaCaptR, la sensibilidad del RBT es mayor al 95% independientemente de la forma clínica de la enfermedad. Lucero *et al.*, 2005 postulan que las infecciones humanas son probablemente más comunes de lo indicado en los informes publicados, y que los métodos serológicos y los criterios para evaluar los resultados varían mucho.

Las técnicas serológicas más utilizadas para detectar los anticuerpos de *B. canis* en humanos son las pruebas de aglutinación. Además informa sobre el uso potencial de este IELISA para el diagnóstico de la brucelosis humana causada por *B. canis* en una población de pacientes que dieron positivo por prueba rápida de aglutinación de diapositivas (RSAT) pero negativa por *B. abortus*. Debido a los resultados obtenidos por trabajos anteriores del grupo de Zoonosis-UNRC, y al único caso reaccionante serológico

durante este trabajo, se debería incluir la técnica de RSAT como prueba tamiz para el diagnóstico de brucelosis de rutina de los estudiantes de la UNRC.

CONCLUSIONES

“Cada día sabemos más y entendemos menos”. Albert

Einstein

CONCLUSIONES

- La prevalencia de estudiantes de la UNRC serorreaccionantes a cepas rugosas de *Brucella* fue del 1,72 %.
- Los resultados serológicos obtenidos en este estudio demuestran la necesidad de incorporar la técnica de RSAT en el estudio de diagnóstico de rutina de brucelosis.
- Es necesario continuar realizando estudios más profundos para identificar los factores ecológicos y epidemiológicos que contribuirían a la presentación de esta zoonosis.
- Es muy alto en nivel de desconocimiento sobre Brucelosis y las formas de transmisión al hombre. Por eso es fundamental promover la difusión y uso de la información epidemiológica para prevenir la enfermedad. Esto se vería posible a partir de la distribución de folletos o infografías en la Dirección de Salud de la UNRC.
- Es fundamental informar sobre la prevención de Brucelosis, no sólo mediante los contenidos curriculares a los estudiantes de Medicina Veterinaria, sino advertir a todos los alumnos de la Universidad sobre el riesgo de exposición al adoptar y convivir con animales sin atención veterinaria.
- Desarrollar estudios para determinar la seroprevalencia en población expuesta a riesgo con cierta regularidad, puede ayudar al control epidemiológico, al establecimiento de planes de mejora, promoción y prevención de la enfermedad.

ANEXO

Técnica de aglutinación con antígeno tamponado (BPA)

Fundamento

Es una prueba tamiz, rápida, práctica y económica que reduce las aglutinaciones inespecíficas y es ligeramente más sensible que la prueba de Rosa de Bengala. El bajo pH del antígeno favorece los laboratorios diagnósticos ya que no requiere equipos costosos.

Especificaciones

Es cualitativa y se interpreta como positiva o negativa.

Muestra requerida

- Suero límpido, no hemolizado
- Conservar los sueros congelados a $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

Reactivos

- Antígeno de BPA, que cumpla con las especificaciones del USDA, volumen celular 11 %, pH 3,65 $\pm 0,02$
- Suero control positivo
- Suero control negativo

Materiales

- Aglutinoscopio (caja de lectura de 45cm de largo x 35 cm de ancho x 15 cm de profundidad), con fondo pintado de negro y con tapa de vidrio
- Mezclador
- Placa de vidrio marcada con cuadrados de 4x4 cm
- Gradillas
- Micropipetas 10-100 μl

Equipos

- Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex

Drogas y soluciones

- Alcohol 70 %
- Hipoclorito de sodio al 0,1 %

Precauciones generales

- Almacenar el antígeno entre 5°C+/-2. Si se congela queda inutilizado
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22°+/- 4°C)
- Antes de usar el antígeno, rotar suavemente el frasco para homogeneizar la suspensión
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la prueba
- La placa de vidrio debe estar limpia, libre de detergentes y seca
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo.
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo

Medidas de bioseguridad

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2 % de preparación diaria
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0,1 % de preparación diaria
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo
- Quitarse la bata al dejar el laboratorio

Técnica

- Colocar 80 µl del suero control positivo en uno de los cuadrados de la placa de vidrio
- Colocar 80 µl del suero control negativo en otro cuadrado de la placa de vidrio
- Colocar 80 µl de suero problema en el tercer cuadrado de la placa de vidrio
- Colocar 30 µl de antígeno cerca del suero
- Mezclar suero y antígeno con palillo o mezclador
- La mezcla debe tener una forma de 27x25mm
- Rotar suavemente la placa de vidrio, colocarla en el aglutinoscopio y tapanla
- A los cuatro minutos rotar nuevamente la placa y continuar la incubación

- A los 8 minutos encender la luz y efectuar la lectura inclinando ligeramente la placa

Lectura e interpretación de los resultados

Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando aparece cualquier aglutinación, aunque sea fina. Si el resultado es positivo realizar una prueba confirmatoria.

Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.

Criterio de aceptación del resultado

Realizar el ensayo a los sueros controles antes que a las muestras. Los resultados deben ser los esperados, positivos o negativos. En caso de discrepancias repetir el ensayo cambiando el lote de antígeno.

Técnica de microaglutinación en portaobjeto (RSAT)

Fundamento

Es una prueba tamiz, rápida, práctica y económica que fue descrita por Carmichael en 1987, para ser aplicada en el diagnóstico de brucelosis canina en perros. La técnica emplea un antígeno preparado con cepa *B. canis* M- de características mucoides que tiene la particularidad de ser estable. Ha sido propuesta para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. canis* en humanos.

Especificaciones

Es cualitativa y se interpreta como positiva o negativa.

Muestra requerida

Suero límpido, no hemolizado. Conservar los sueros congelados a $-20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$

Reactivos

- Antígeno de RSAT
- Suero control positivo de alto título
- Suero control negativo

Materiales

- Portaobjeto 25x75mm
- Gradillas
- Micropipetas 0.5-10 μl

- Micropipetas 10-100µl

Equipos

Refrigeradora; Freezer; Estufa; Centrífuga; Timer; Vortex, Microscopio

Drogas y soluciones

- Alcohol 70 %
- Hipoclorito de sodio al 0,1 %
- Solución fisiológica al 0,85 %
- Cloruro de sodio

Precauciones generales

- Almacenar el antígeno a 5°C +/-2°C. Si se congela queda inutilizado
- Para realizar la prueba tanto el antígeno como el suero deben estar a temperatura ambiente (22+/- 4°C)
- Verificar la fecha de vencimiento del antígeno antes de realizar la prueba
- Almacenar el 2-mercaptoetanol a temperatura ambiente y en recipiente perfectamente cerrado
- Los portaobjetos deben estar limpios y secos
- Homogeneizar los sueros antes de realizar el ensayo
- Utilizar un suero control positivo y un suero control negativo

Medidas de bioseguridad y seguridad

- Al ingresar al laboratorio de serología vestir equipo de protección personal (Bata, calzado cerrado, cabello recogido) de acuerdo a las recomendaciones del Manual de Bioseguridad de la OMS, 2005.
- Al manipular muestras de sangre utilizar guantes y seguir las instrucciones de la Resolución 228/93 del Ministerio de Salud.
- Descartar los tips en solución de hipoclorito de sodio al 2 % de preparación diaria.
- Descartar las muestras de acuerdo a las indicaciones de la Ley 24051 de Residuos Peligrosos.
- Manipular el 2-mercaptoetanol de acuerdo a las instrucciones del manual de seguridad
- Limpiar el área de trabajo al finalizar la tarea con hipoclorito de sodio al 0,1 % de preparación diaria.
- Quitarse los guantes y lavarse las manos al terminar el trabajo.

- Quitarse la bata al dejar el laboratorio.

Técnica

- En un portaobjeto mezclar 10 ul de suero con 10 ul de antígeno (previamente homogeneizado a temperatura ambiente).
 - Rotar suavemente el portaobjeto con la mezcla, durante 1 minuto.
 - Leer al microscopio (10x).
 - Microaglutinación con 2 mercapto-etanol (ME)
 - Mezclar 25 ul de suero con 25 ul de 2- ME 0.2M en un portaobjeto grande.
 - Esperar 1 minuto.
 - Agregar 50 ul de antígeno. Mezclar agitando suavemente el portaobjeto durante 2 minutos.
 - Leer al microscopio (10X)

Lectura e interpretación de los resultados

- Positivo: El ensayo se clasifica como positivo cuando aparece cualquier aglutinación, aunque sea fina. Si el resultado es positivo realizar una prueba confirmatoria.
- Negativo: La ausencia de aglutinación se interpreta como negativo.

Criterio de aceptación del resultado

Realizar el ensayo a los sueros controles antes que a las muestras. Los resultados deben ser los esperados, positivos o negativos. En caso de discrepancias repetir el ensayo cambiando el lote de antígeno.

Diagnostico bacteriológico

Teniendo en cuenta que el hombre actúa como indicador de la enfermedad los estudios bacteriológicos aportan importante información epidemiológica.

Aislamiento

Las especies del género *Brucella* tienen un reservorio preferencial definido, por esa razón el diagnóstico bacteriológico adquiere importancia, ya que puede indicar la fuente de infección y la probable localización geográfica. Las cepas se pueden recuperar a partir de sangre, médula, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, biopsias u otros materiales. La toma de la muestra se debe hacer lo antes posible para que el tratamiento con antibióticos no interfiera en el resultado. Se recomiendan tres muestras en medio de cultivo monofásico o una en medio de cultivo de equipo automatizado, en un período de 24 horas,

preferentemente durante la etapa febril del paciente. Si no se dispone de facilidades para continuar con el proceso de la muestra y se traslada a otra institución, tener la precaución de acondicionarla en recipientes triples, para envío de material para diagnóstico, con las etiquetas correspondientes de acuerdo a las normas de bioseguridad internacionales. La incubación se realiza a $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ en atmósfera con 10 % de CO_2 . Cuando se emplean medios de cultivo líquidos estáticos, se requieren pasajes periódicos a medio de cultivo sólido para evitarla disociación de las colonias. También es recomendable utilizar medios de cultivo bifásicos. Generalmente los hemocultivos requieren un período de incubación prolongado, por esa razón no se descartan como negativos antes de los 30 días. Las colonias, pequeñas, translúcidas y de bordes lisos, se pueden visualizar en un medio de cultivo sólido a partir de las 48 h de incubación.

Encuesta realizada en el centro de salud de la Universidad Nacional De Río Cuarto

Apellido y nombre:.....**DNI:**.....**FECHA:**.../.../.....

1) DATOS PERSONALES

- 1.- Dirección en RÍO CUARTO.....2.-Barrio:.....
3.- Celular:.....E-mail:.....face:.....
4.- Domicilio de ORIGEN:.....Ciudad.....TE:.....
5. Ud. está cursando..... (1º,2º, etc.) año de la carrera (Indicar carrera)
6. Ud. fue muestreado en el Centro de Salud con anterioridad? Si - No. En que año?.....

2) ANTECEDENTES:

- ¿De qué Colegio secundario egresó?:
¿Tenía orientación Agrotécnica? (marque con un círculo) Si - No
¿Tiene antecedentes laborales con relación a producción animal? Si - No
¿Tipo de actividad? TAMBO – PRODUCCIÓN DE: BOVINOS - CERDOS – CABRAS – OVINOS – OTRAS
(.....)
¿Consumo productos lácteos de origen “casero”? (quesos frescos, muzzarella) Si - No

3) PERROS Y OTROS ANIMALES

- 3. a) Presencia de perros** ¿Posee perros en su domicilio de ORIGEN?: Si - No Cantidad de perros:.....
Si Ud. no es de Río Cuarto, ¿posee perros en su domicilio de estudiante?: Si - No Cantidad de perros:
Ha tenido contacto con material de abortos de caninos, bovinos, porcinos? Si - No
3. b) Otros animales Porcinos (cuántos)..... Bovinos (cuántos)..... Equinos (cuántos).....
 Aves de corral..... Otros: especificar especie y número.....

4) CARACTERISTICAS DEL PERIDOMICILIO (Entorno que rodea la vivienda):

- 4. a) En su domicilio de origen posee:** Corrales Depósito de leña Gallinero
 Huerta Tierra Cemento Presencia de basura en zona de 100 mts a la redonda

Disposición de basura en su domicilio de origen

- Con recolección diaria Con recolección día por medio
 Sin recolección (en el caso “sin recolección”, cite tipo de tratamiento:)

- 4. b) Domicilio estudiantil en Río Cuarto:** Corrales leña Gallinero Huerta Tierra Cemento
basura a 100 mt

Disposición de basura en su domicilio estudiantil

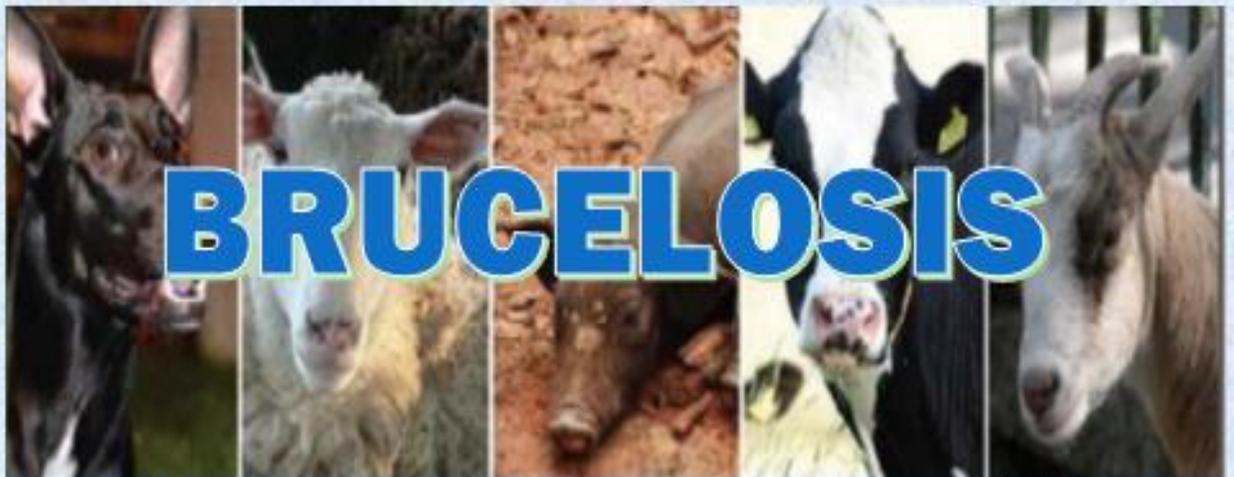
- Con recolección diaria Con recolección día por medio
 Sin recolección (en el caso “sin recolección”, cite tipo de tratamiento:)

4. c) Presencia de Roedores (en ambos domicilios)

- Roedores SI – NO ¿Observó roedores cerca de su domicilio? SI - NO ¿Utilizó raticidas alguna vez? SI - NO

PREGUNTAS PARA BRUCELOSIS

- 1.- ¿Recibió información sobre la Brucelosis? SI NO
Medios que le informaron: Escuela – Dispensario – Radio – Televisión – Universidad- otros:
2.- ¿Sabe Ud. quién transmite esta enfermedad?..... ¿Quiénes?.....
3.- ¿Sabe Ud. cómo se trasmite la enfermedad?.....¿Cómo?.....
4.- ¿Sabe Ud. qué daño produce en el hombre?.....¿Cuáles?.....



Es una enfermedad aguda que puede volverse crónica producida por una bacteria que algunos animales –como las vacas, ovejas, cabras, cerdos y perros- pueden transmitir a las personas.

SÍNTOMAS CLÍNICOS



Los signos clínicos pueden aparecer en forma insidiosa y abrupta. En general, la brucelosis comienza como una enfermedad febril aguda con signos no específicos, similares a los de la gripe, como

- fiebre,
- dolor de cabeza,
- malestar, dolor de espalda, mialgia y dolores generalizados.

Los signos gastrointestinales que incluyen anorexia, náuseas, vómitos, diarrea y constipación.

VOS PODÉS CUIDARTE

La brucelosis en humanos generalmente se previene al controlar la infección en los animales.

- Hervir la leche no pasteurizada (5 minutos desde que rompe el hervor) antes de beberla o elaborar productos lácteos.
- Una buena higiene y vestimenta y equipos de protección son muy importantes para prevenir la exposición durante el trabajo.
- Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación de la piel, además de la inhalación o ingestión accidental de organismos al asistir un parto, realizar una necropsia o al carnear un animal para el consumo.

No existen vacunas para perros. Consultá siempre a tu veterinario de confianza sobre peligros potenciales para la salud humana, por convivir con mascotas infectadas con brucelosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Abuin, J. 2006. "Brucelosis" Temas de zoonosis III. Asociación Argentina de Zoonosis.
- Acha P.; Szyfres, B. 2003 Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3º edición. 1(3). Organización Panamericana de la Salud, Washington, USA. pp. 989.
- Almaraz Gómez, A.; Rodríguez Torres, A. 2001. Epidemiología y Prevención de la Brucelosis como Enfermedad Profesional *In: Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León*, pp. 45 – 62.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institute National de la Reserche Agronomique, Paris, France.
- Álvarez, E., Larrieu, E. ; Cavagion, L. 1990. Aportes al conocimiento del riesgo del ejercicio de la profesión veterinaria. *Vet. Arg.* 7: 58-64.
- Álvarez-Hernández, N.E.; Díaz-Flores M.; Ortiz-Reynoso M. 2015 Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Medicina e Investigación* 3(2):129-133.
- Ardoino M, Baruta A, Toso E. 2006. Brucelosis canina. *Cien Vet*; 8 (1): 49-60.
- Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R. 2005 Cyclic beta-1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.*;6:618-25.
- Ariza J. 2002 Brucelosis en el siglo XXI. *Med Clin (Barc)*.119: 339-44.
- Ariza J, Pellicer T, Pallarés R, Foz A, Gudiol F. 1992 Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis.*;14:131-40.
- Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, 2007 Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med.*; 4:e317.
- Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM. 2011 Interactions of the human pathogenic Brucella species with their hosts. *Annu Rev Microbiol.*65:523-41.
- Ballut J.C, Calderón A, Rodríguez V. 2013. Brucelosis en hembras caninas en Montería (Colombia): un problema para la salud pública. *Biosalud*; 12(2):66-74.
- Baruta DA, Ardoino SM, Brandan JL, Riesco S, Oriani D, Mariano E. 2003. Estudio seroepidemiológico de brucelosis canina en General Pico, Provincia de la Pampa, Argentina. *Veterinaria* 5: 11-6.
- Barg, L.; Godoy, A. M.; Peres, J. 1978. Pesquisa de aglutininas para *B. abortus* e *B.canis* em soro de escolares no Estado de Santa Catarina. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, Vol. 30,pp. 307 - 310.
- Benenson, A. 1992. Brucelosis. *In: El control de las enfermedades transmisibles en el hombre.* 15º Edicion. Publi. Cient. Nº 538. OPS, pp. 30 -33.
- Blasco, J. M. 2001. Brucelosis Animal: La Enfermedad y Medidas para su Control y Erradicación. *En: Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León, Impreso por Heraldo de Zamora*, pp. 31 - 43.

- Bhardwaj SS, Saxena R, Kwo PY. 2009 Granulomatous liver disease. *Curr Gastro enterol Rep.*; 11:42-9.
- Boeri E., Escobar G.I, Ayala S.M, Sosa-Estani S, Lucero N.E. 2008. Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina*; 68:291-297.
- Borie, C.; Pinochet, L. 1987. Brucelosis canina: conceptos generales y estudios realizados en el país. *Monografías Med. Vet.* 9 (2): 70-78.
- Borie, C.; Galarce, N. 2015. *Brucella canis*. *Rev. Chil. Infectol.* 2 (2): 219-220.
- Bricker, B. J.; Ewalt, D. R.; MacMillan, A. P.; Foster, G.; Brew, S. 2000. Molecular Characterization of *Brucella* Strains Isolated from Marine Mammals. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1258 - 1262.
- Briseño González, H.; Páramo Ramírez, R. M.; Flores Castro, R.; Suárez Güemes, F. 2004. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *B. canis*. *Veterinaria México*, 35: 121-128.
- Burne RA, Chen YYM. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microb Infect.* 2000; 2:533-42.
- Carámbula, P. 2010 *Brucelosis* [Consulta: abril 2018]. Disponible en: <http://www.sanar.org/enfermedades/brucelosis>.
- Carmichael, L. E.; Greene, C. E. 1996. Capítulo: Brucelosis canina. In: *Enfermedades Infecciosas, perros y gatos*. Primera Edición. Editorial Interamericana McGraw - Hill, pp. 604 - 616.
- Carmichael, L. E.; Shin, S. J. 1996. Canine Brucellosis: a Diagnostician's Dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)*. Vol. 11, N° 3 (Agosto), pp.161 – 165.
- Carmichael, L. E.; Shin, S. J. 1999. Brucelosis canina causada por *Brucella canis*. In: *Recent Advances in Canine Infections Disease*. Disponible en www.ivis.org.
- Cardona Pulgarín, V., Peñuela Correa, L. F. 2016. Caracterización de las instituciones veterinarias y evaluación retrospectiva de la casuística de enfermedades zoonóticas en caninos en el municipio de Pereira–2015 (Bachelor's thesis, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira).
- Carmichael, L. 2008. Brucelosis In: *Enfermedades Infecciosas Perros y Gatos*. Green Ed. Interm 411-424.
- Castillo V.; Cotrino V.; Moreno C. Encuesta Serológica sobre *Brucella canis* en Pacientes Atendidos en la Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá (online). Disponible en: www.lmvltda.com/programas/ar14.html. Acceso en abril 2018.
- Castrillón-Salazar L, Giraldo-Echeverri CA, Sánchez-Jiménez MM, Olivera-Angel M. 2013 *Factores asociados con la seropositividad a B. canis en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia, Colombia*. *Cad Saúde Pública*; 29:1955-73. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00133013>

•Castro, H., González S., Prat M. 2005. "Brucelosis: una revisión práctica". *Acta Bioq Clín Lat*, 39 (2): 203-216.

•Celli J, Gorvel J. Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7:93-7.

•Centers for Disease Control and Prevention 2005 Oct. Brucellosis (*Brucella melitensis*, abortus, suis, *canis*). CDC; Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_t.htm. Accessed 4 Jun 2007.

•Cepanço, 1982. Métodos serológicos para el diagnóstico de la brucelosis ovina y canina.

•Chassagnade, M.; Chiaretta, A.; Martín, V; Bessone, A; 2004 "EDUCACIÓN PARA LA SALUD Y ENFERMEDADES ZOONÓTICAS" IV Congreso Argentino de Zoonosis. Bs. As.

•Coll Jordá, D; Arteagoitia Axpe, J. M.; Martínez Navarro, F. 1997. Evaluación de la Vigilancia Epidemiológica de la Brucelosis en la Comunidad Autónoma del País Vasco. *Revista Española de Salud*.

•Colmenero JD, Fernández-Gallardo LC, Agúndez JA, Sedeño J, Benítez J, Valverde E. 1994 Possible implications of doxycycline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother.*;38:2798-802. Pública. 71 (2), pp. 181 - 187.

•Colmenero JD, Porras JJ, Valdivielso P, Porras JA, de Ramón E, Cause M, et al. Brucellosis: estudio prospectivo de 100 casos. *Med Clin (Barc)*. 1986;86:43-8.

•Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sánchez-De-Mora D, Delgado M, Cause M, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)*.1996; 75:195-211.

•Colmenero JD, Suarez-Muñoz MA, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Morata P. 2002 Late reactivation of calcified granuloma in a patient with chronic suppurative brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*; 21:897-9.

•Colmenero JD, Muñoz-Roca NL, Bermúdez P, Plata A, Villalobos A, Reguera JM. Clinical findings, diagnostic approach, and outcome of *Brucella melitensis* epididymo-orchitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57.

•Corbel, M.J., 1990. Brucella. In: Parker, T., Collier, L.H. (Eds.), *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Edward Arnold, London, pp. 341–353.

• Corbel, M. J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Disease*. Vol. 3, N° 2, pp. 213 - 221.

•Córdoba G, Vera VJ, Correa J, Ramírez GC. 2015 Comportamiento del virus de la bronquitis infecciosa aviar en aves con sintomatología respiratoria provenientes de granjas de producción del Departamento de Cundinamarca. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas [Internet]*; 13(23):47–64. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000100005&lang=es.

•Cortina M., Analía Novaka, Luciano J. Mellia, Sebastián Elenab, Natalia Corberac, Juan E. Romerod, Ana M. Nicolab, Juan E. Ugaldea, Diego J. Comercia, Andrés E. Ciocchinia. 2017 *Development of improved enzyme-based and lateral flow immunoassays for rapid and accurate serodiagnosis of canine brucellosis*. Buenos Aires, Argentina.

•De la Cuesta-Zuluaga JJ, Sánchez-Jiménez MM, Martínez- Garro J, Olivera-Angel M. 2013 Identification of the virB operon genes encoding the type IV secretion system, in Colombian *Brucella canis* isolates. *Vet Microbiol*.63:196-9.

•Díaz Aparicio E. 2013 Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev sci tech Off int Epiz [Internet]*.;32(1):43–51. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/7912/0de6d16d-5ff33ed19b6051f3204ea6373d9d.pdf>.

•Díaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I. 2011 The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.*; 5:e950

•Eisenberg, T., Hamann, H.-P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., Zschöck, M. 2012. Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. from Frogs. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3753–3755.

•Erdem H, Kilic S, Sener B, Acikel C, Alp E, Karahocagil M, 2013 Diagnosis of chronic brucellar meningitis and meningoencephalitis: the results of the Istanbul-2 study. *Clin Microbiol Infect*.19: E80-6.

•Estein SM. 2006. Brucelosis: inmunidad y vacunación. *Revista electrónica de veterinaria*, 7(5): 1-25.

•Fernández Fernández MA, García de Paso Mora M, Mateos Checa R, Croche B, Porrás González A, Obando Santaella 2010 I. Brucellosis infection presenting with cholestasis. *Int J Infect Dis*.14: 322-24.

•Foster G, Osterman, BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. 2007 *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*.57 (11): 2688-93.).

•Gallo G; Martín V; Bessone A.; 2004. “Seroprevalencia de Brucelosis en poblaciones humana y canina de zona urbana y rural, Departamento de Río Cuarto”. XV Reunión Científico Técnica AAVLD, Buenos Aires.

•Garrity GM, Holt JG. 2001 Taxonomic outline of the Archea En: Boone DR, Castenholz RC, editors. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. New York, NY, Springer-Verlag, p. 155-66.

•Guzmán-Hernández RL, Contreras-Rodríguez A, Ávila-Calderón ED, Morales-García MR. 2016 Brucelosis: zoonosis de importancia en México. *Rev Chil Infectología [Internet]*. 33(6):656–62. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000600007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

•Greene CE, Carmichael LE. 2006 Canine brucellosis. En: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat*.3.^a ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier;p. 369-81.

- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/ human.
- Hasanjani Roushan MR, Mohraz M, Hajiahmadi M, Ramzani A, Valayati AA. 2006. Efficacy of gentamicin plus doxycycline versus streptomycin plus doxycycline in the treatment of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 42:1075-80.
- Hong W, Sano K, Morimatsu S, Scott DR, Weeks DL, Sachs G, 2003 Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol.*52:211-6.
- Jaramillo L., Arboleda M., Verónica García V., Agudelo-Flórez P. 2014 *Coinfección brucellosis-leptospirosis*, Urabá, Colombia.
- Kerwin, S. C.; Lewis, D. D.; Hribernik, T. N.; Partington, B.; Hosgood, G.; Eilts, B. E.1992. Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201: 1253-1257.
- Koneman, E.; Allen, S.; Jando, W.; Schreckenberger, P.; Winn, W. 1999. Bacilos Gram Negativos Exigentes. In: *Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas en Color.*5° Edición. Editorial Panamericana, pp. 424 - 430.
- Kose SW, Smits H, Abdoel T, Ozbel Y. 2006 Prevalence of *Brucella* antibodies in rural and suburban communities in three provinces of Turkey: need for improved diagnosis and prevention. *J Infect*; 53: 308-314.
- Kressler Beraha, N. 2014 Estudio de prevalencia de *Brucella spp* en caninos (*canis familiaris*), en el sector de Ancholag, parroquia Juan Montalvo, en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha, Ecuador [En línea] (Tesis) (Trabajo de Investigación) Universidad de las Américas, Facultad de Ciencias de la Salud, Pichincha-Ecuador.
- Lawaczek E, Toporek J, Cwikla J, Mathison BS. 2011 *B. canis in a HIV-Infected Patient*. *Zoonoses Public Hlth.* 58:150-2.
- Lee SI, Islam MA, Khatun MM, Choi GY, Jung JM, Baek BK, Kakoma I. 2010 *Immunoglobulin profiles in acute Brucellosis experimentally induced by B. canis in BALB/c mice*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10:927-30.
- López Merino, A. 2018 Capitulo: *Brucella*. In: *Microbios en Línea (on line)*. Editores: Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Disponible en <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap7.html>.
- López Guarnizo P. 2012 Estudio descriptivo de la presentación de brucelosis humana en Colombia desde 2000 hasta 2012. *Rev Med Vet.*; 28:67–79.
- Lucero, N. 1996. Capítulo: *Brucella*. In: *Microbiología Médica, Primera Edición*. Por Basualdo, J. A.; Coto, C. E.; de Torres, R. A. Editorial Atlante S. R. L., pp. 285 - 295. the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med*; 102:118–131.

•Lucero, N. 2004. Diagnostico Serológico y Bacteriológico de Brucelosis humana y canina. Tema de Zoonosis II. ISBN 987 97 038-1-2. Asociación Argentina de Zoonosis. 159-164.

•Lucero, N.E., Corazza, R., Almuzara, M.N., Reyes, E., Escobar, G.I., Boeri, E., Ayala, S.M., 2010. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiology and Infection*; 138, 280–285.

•Lugo, A. 2010 “Brucelosis Humana en estudiantes de la Escuela de Bioanálisis, Universidad De Los Andes-Venezuela”. Revista Salud Publica y Nutrición RESPYN [En línea], (Mérida -Venezuela) 11 (4), pp.2-4. [Consulta: mayo 2018]. Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/xi/4/articulos/brucelosis_humana.htm.

•Manias V, Nagel A, Mollerach A, Mendosa M.A., Freyre H., Gómez A., Ferrara E., Vay C., Méndez E. 2013 Endocarditis por *Brucella canis*: primer caso documentado en un paciente adulto en Argentina. Santa Fe, Argentina.

•Martín V.; Gallo, G. 2004 Seroprevalencia de brucelosis en poblaciones humana y canina de zona urbana y rural (Dpto Río IV) XV Reunión científico técnica de la AAVLD, Bs As.

•Martín V; Molina I; Vissio C.; Richardet M.; Fiorimanti M.; Delannoy E.; Espósito N.; Arrieta E.; Ceballos V.; Aguirre V.; Gatti C. 2015 *Seroprevalencia de Brucella spp en estudiantes de Medicina Veterinaria. UNRC. XVII Simposio Internacional sobre enfermedades desatendidas, Mundo Sano, Bs As.*

Martín-Martín AI, Vizcaíno N, Fernández-Lago L. 2010 Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes Infect.* 12:246-51.

•Maza, M., & Morales, S. 2016. *Seroprevalencia de Brucelosis Canina en el Distrito de Los Olivos, Lima, Perú.* Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 27(2), 375-380.

•Ministerio de Salud de la Nación. 2013. En: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>. Consultado: 18-10-2017.

•Moreno E, Gorvel JP. 2004 Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non professional phagocytes. En: López-Goñi I, Moriyón I, editores. *Brucella: molecular and cellular biology*. 1.^a ed. Norfolk: Horizon Bioscience; p. 280-306.

•Moya Durán, S. J. 2016. Detección de anticuerpos contra *B. canis* y *Leptospira spp.* en cánidos silvestres y domésticos de la isla grande de Tierra del Fuego, Región de Magallanes y Antártica Chilena.

•Myers DM, Varela-Díaz VM. 1980 *Serological and bacteriological detection of B. canis infection of stray dogs in Moreno, Argentina.* *Cornell Vet*; 70: 258-65.

•OMS, 2012. Informe sobre la salud en el mundo. Capítulo 3. Percepción de los riesgos, pp. 31-50.

•Orduña Domingo, A.; Bratos Pérez, M. A.; Abad Fernández, R.; Ruiz García, L.; De Frutos Serna, M.; Rodríguez Torres, A. 2001a. Capítulo: La Brucelosis. Etiología y Origen de la Infección Humana. En: Manual de Brucelosis. Junta de Castilla y León. Pp. 13 - 20.

•Orduña Domingo, A.; Zarsoza Santamarta, M. P.; Abad Fernández, R.; Dueñas Diez, A.; Mantecón, M. A.; Eiros Bouza, J. M.; Rodríguez Torres, A. 2001c. Capítulo: Diagnóstico Microbiológico de la Brucelosis. Junta de Castilla y León, pp. 121 – 139.

•Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, 2002 *The Brucella suis genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts*. Proc Natl Acad Sci USA. 99:13148–53.

•Palomares-Resendiz E, Arellano-Reynoso B, Hernández-Castro R, Tenorio-Gutiérrez V, Salas-Téllez E, Suárez-Güemez FDAE. 2012 Immunogenic response of *Brucella canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. Front Cell Infect Microbiol.2:1-5

•Pei J, Ficht TA. 2004 *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. Infect Immun.72: 440-50.

•Piampiano P, McLeary M, Young LW, Janner D. 2000 *Brucellosis: unusual presentations in two adolescent boys*. Pediatr Radiol.30:355-7.

•Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Bravo MJ, García-Ordoñez MA, Morata P. 2008 Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. Clin Microbiol Infect.14:1128-34

•Rambow-Larsen AA, Petersen EM, Gourley CR, Splitter GA. 2009 *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. Trends Microbiol.17:371-7.

•Rincón Valenzuela CE, Flórez Sánchez AC. 2009 Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de cisticercosis en el Municipio de Mitú, Colombia. Nov - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. 7(12):143–7.

•Rittig MG, Alvarez-Martinez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot B. 2001 Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. Infect Immun.69:3995-4006.

•Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gemsa D. 2003 Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. J Leuk Biol. 74:1045-55.

•Rodrigues, F. S., de Souza, G. V., Magalhães, I. L. A., Colares, R. R., & Santiago, S. L. T. 2016. Brucelose Canina: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA*, 10(4), 870-888.

•Roop M, Gaines M, Anderson S, Caswell C, Martin W. 2009 Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Med Microbiol Immunol.198:4.

•Rosales-Zambrano, Datty . 2014. Aspectos básicos del género *Brucella*. Disponible en: <https://es.slideshare.net/DattyRosales/caracteristicas-genero-brucella>. Acceso en mayo de 2018

•Sagi M, Neshar L, Yagupsky P. 2017 The bactec FX blood culture system detects brucella melitensis bacteremia in adult patients within the routine 1-week incubation period. *J Clin Microbiol*.55: 942-6.

•Sangari FJ, Seoane A, Rodríguez MC, Agüero J, Lobo JMG. 2007 Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun*.75:774-80.

•Sangari FJ, Cayón AM, Seoane A, García-lobo JM. 2010 *Brucella abortus* ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC Microbiol*. 10:107-18.

•Samartino Luis E. 2002. Brucellosis in Argentina. INTA Castelar, Buenos Aires.

•Sánchez de Navas, A. M.; Zamorano Rodríguez, M. L.; Maqueda Blasco, J.; Pérez González, M. L. 2004. Medicina Laboral. Brucelosis: Normas Preventivas. Disponible en:www.estrucplan.com.ar/Producciones/Entrega.asp?identrega=179.

•Scheftel J. 2003 *Brucella canis*: Potential for zoonotic transmission. *Comp Contin Edu Practicing Vet*. 25:846-52.

•Smeak, D. D.; Olmstead, M. L.; Hohn, R. B. 1987. *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 191: 986-990

•Scholz H C, 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 (2): 375-82.

•Scholz H C, Nöckler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H-2010 *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*; 60 (4): 801-8.

•Scholz H C, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl J A, Zygmunt M S, Cloeckeaert A-2016 *Brucella vulpissp.* nov. a novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Austria. *Int J Syst Evol Microbiol*.

•Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD. 2003 Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis*. 9:485-8.

•Soloaga R, Salinas A, Potallo M, Margari A, Suar B, Lucero N. 2004 Bacteriemia por *B. canis*. Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Rev Argent Microbiol*. Pp:36:81

•Tarabla, H.D., 2007. Riesgos de trabajo en Veterinaria en el Centro-Oeste Santafesino. 5° Jorn. Internac. Vet. Práctica, Mar del Plata, Buenos Aires.

•Trabattoni, E; Lavarón, O., 2004. Prevalencia de brucelosis en alumnos. *Rev. FAVE*. 3(1-2) pp:25-31.

- Trabattoni, E., Lavaroni, O., Vera, E. y Garcia, N. 2004 Prevalencia de brucelosis en alumnos y docentes de ciencias veterinarias de Esperanza en el año 2002. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 3
- Torioni de Echaide, Susana 2017. INTA EEA Rafaela *Respuesta inmune de organismos intracelulares.*
- Ugnia, L., Sequeira, G., Tarabla, H., Weyers, A., Esposito, N. 2008. Percepción y actitud frente a factores de riesgo ambientales y zoonosis. III Congr. Latinoam. y VI Argentino de Zoonosis, Bs As SP 142.
- Von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. 2012 Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev.*;36:533-62.
- Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati C. 2004 *Human infection with M-strain of B. canis.* *Emerg Infect Dis.* Pp: 10:146–8.
- Wanke MM. Canine brucellosis. 2004 *Animal Reproduction Science*; 82-83: 195-07.
- Watarai M, Makino SI, Fujii Y, Okamoto K, Shirhata T. 2002 Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol.* Pp:4:341-55.
- Whatmore A M, Davison N, Cloeckert A, Al Dahouk S, Zygmunt M S, Brew S D. 2014 *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.) *Int J Syst Evol Microbiol*; 64 (12): 4120-8.)
- Ying W, Nguyen MQ, Jahre JA. 1999 *B. canis endocarditis: case report.* *Clin Infect Dis* 29:1593-4.
- Young, EJ. 1995 An overview of human brucellosis.. *Clin Infect Dis.*21:283-90.
- Zavala M, Morales S. 2016. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en perros del distrito de Pucusana, Lima, Perú. *Rev Investig Vet Perú*, 27 (2): 370–374.