



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

**“ASPECTOS CLINICOS Y SUBCLINICOS  
DE BRUCELOSIS CANINA EN SAN JUAN”**

**Trabajo Final para acceder al título de  
Especialista en Clínica Médica de Perros y Gatos**

**M.V. Esp. María Virginia Carrillo Moreno  
DIRECTORA: M.V. MSc. Vivian Martin (UNRC)  
CODIRECTOR: M.V. MSc. Sebastián Alejandro Elena (SENASA)**

**Río Cuarto 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a la M.V. MSc, Vivian Martin directora de esta tesis, que sin cansancio y constante dedicación, orientación y vocación docente me guio con paciencia a comprender y realizar esta tesis. Su enorme capacidad profesional y su calidad humana me hicieron crecer académica y personalmente.

A mi co-director M.V. MSc, Sebastian Elena, que con su gran predisposición permitio nuestra visita al SENASA y con sus importantes aportes, materiales brindados y claridad me explico todo lo necesario en cuanto a técnicas diagnosticas, lo que resulto en un aprendizaje significativo y luego poder expresarlas en este trabajo.

A Claudina Vissio docente de la UNRC, quien colaboro en la realización de los resultados con su ayuda en estadística.

A mi papá Armando, a mi mama Beatriz, a mis hermanos Gerardo y Pablo que con su ayuda incondicional permitieron que yo pudiera dedicarle más tiempo a esta actividad y por empujarme a crecer siempre.

A mis amadas sobrinas Agustina, Emilia y Constanza, por saber comprender en todos aquellos momentos que no pudimos estar juntas, para poder hacer este trabajo.

A mi novio Jorge con el cual compartimos mucho, desde el cursado completo de la Especialidad hasta la realización de la tesis, ayudándonos mutuamente en lo que necesitábamos.

Al Medico Veterinario del quirófano municipal de Santa Lucia, Octavio Bustos y a Karina quienes muy amablemente nos permitieron el acceso para la toma de muestra a los animales, como asi también a la Med. Vet. Veronica Perez, que desde su rol en la Salud Publica nos brindo su apoyo.

Al Laboratorio Veterinario de San Juan y a todos los colegas por las muestras enviadas, por que sin su ayuda esto no hubiese sido posible.

A Graciela, mi amiga y profesora titular de la cathedra de Anatomia y Fisiologia Animal de la UNSJ, en la cual trabajamos, que estuvo siempre atenta a lo que necesitara, ayudándome con la búsqueda bibliográfica, la escritura y especialmente conteniendome en los buenos y malos momentos.

A mis amigos por la colaboración de cada uno de ellos, por estar a mi lado y por el apoyo de siempre.

A mis compañeros de la carrera por estar siempre dispuestos a colaborar y por su valiosa participación en evacuar dudas que sirvieran para completar esta tesis.

A Cinty y Evelin que colaboraron en la confeccion de excel y algunas figuras.

A todos ellos mi sincero y profundo agradecimiento por su colaboración y muestra de afecto ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

## **Resumen**

La Brucelosis es una de las enfermedades más estudiadas, ya que existen muchas investigaciones y publicaciones referidas al conocimiento de la prevalencia y/o incidencia en los diferentes países y en las diferentes especies animales (Galvis Banegas, 2003; Chacon-Diaz *et al.* 2015; Greene y Carmichael, 2015).

Es clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dentro de la categoría de enfermedades infecciosas de origen bacteriano relacionada con salud ocupacional y enfermedades de tipo profesional de notificación obligatoria. En Argentina la OMS ubica ésta afección en cuarto lugar entre las enfermedades crónicas transmisibles, generando problemas médico-asistenciales, veterinarios, económicos y laborales (Lavaroni *et al.*, 2011), siendo una infección considerada de riesgo ocupacional, incluida en la lista de enfermedades profesionales desde 1932 (BEP, 2010).

En la provincia de San Juan, las enfermedades endémicas presentan una gran subnotificación y no existen trabajos científicos realizados que describan la realidad epidemiológica de la Brucelosis canina y menos aún en el Departamento de Santa Lucía. Existen casos clínicos confirmados en clínicas privadas, pero no se conoce la prevalencia real, ni las variables fisiológicas que condicionan la presencia de esta enfermedad en la provincia ya que existen condiciones epidemiológicas en San Juan para que la Brucelosis se presente como enfermedad en caninos con potencial zoonótico, y puede estar subdiagnosticada por la falta de manifestaciones clínicas específicas, o en muchos casos, porque la gente no consulta a los Médicos Veterinarios. Sin brucelosis animal no existe la enfermedad humana, por lo tanto, el diagnóstico de la infección en los animales por detección serológica y la identificación de animales sospechosos, probables y confirmados, constituye un aporte fundamental para realizar las intervenciones de control que correspondan.

Para las Técnicas Serológicas se realizaron las pruebas de antígeno tamponado en placa (BPA), aglutinación rápida en porta objeto (RSAT) con y sin agregado de 2-ME, inmunodifusión en gel de agar (IDGA), y Hemocultivo del microorganismo.

Como experiencia se realizó en el laboratorio de Brucelosis del SENASA Martínez de Bs As, el diagnóstico serológico de *Brucella Canis*, con el kit VETLIS Brucella iELISA Caninos indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPSr) de *Brucella canis* en muestras de suero. Este estudio se constituye en el segundo trabajo de este tipo efectuado a nivel nacional.

En el Análisis estadístico: se describió la frecuencia de exposición a diferentes variables fisiológicas relacionadas a la presentación de la enfermedad. Se describió la frecuencia de presentación de signos clínicos y subclínicos en animales serológicamente positivos a brucelosis canina. Los datos obtenidos se procesaron en un Software Infostat (Di Rienzo y col. 2016).

En el presente trabajo, se realizó un estudio descriptivo, observacional, con un muestreo no probabilístico en el Departamento de Santa Lucia de la Provincia de San Juan, entre los meses de julio del 2017 a julio del año 2018. Se contó con la participación conjunta de los Médicos Veterinarios a cargo del único quirófano municipal de castración y el personal a cargo del municipio. Además, se trabajó con siete clínicas privadas y el Laboratorio Veterinario de la Provincia de San Juan. Se consideraron dos poblaciones: Población 1 : en donde se evaluaron 27 caninos derivados de 7 clínicas privadas de San Juan, con síntomas compatibles de la enfermedad (casos sospechosos o probables), como también aquellos animales que viven con ellos. A estos animales se les efectuó un examen clínico completo, cuyos datos se volcaron en una ficha clínica general, identificada numéricamente y además se les realizó hemograma completo. Para la Población 2 se muestrearon 100 animales en el periodo de noviembre y diciembre del año 2017. El muestreo se hizo al azar, de los perros que asistían al quirófano municipal para ser sometidos a la técnica quirúrgica de ovario-histerectomía y orquiectomía, provenientes de viviendas particulares y callejeros llevados por la “Fundación Patitas sin Hogar”. Se les realizó la misma ficha clínica general, la cual también está identificada numéricamente, con los datos de filiación del paciente, anamnesis y se determinaron las variables fisiológicas, para clasificarlos. Previo al procedimiento de extracción de la muestra, a los propietarios de cada canino muestreado, se les realizó una encuesta organizada con preguntas cerradas y se evaluaron aspectos importantes relacionados con la enfermedad.

Sobre un total de 127 caninos muestreados, se establecen tres categorías de animales de acuerdo a diferentes criterios de interpretación: Confirmados (9), Sospechosos (4) y Sanos (114)

Con motivo de realizar una evaluación y seguimiento clínico, posteriormente a los animales muestreados que resultaron positivos a las técnicas anteriormente mencionadas, se les realizó el hemocultivo y se les hizo un seguimiento clínico y subclínico, examinando con detalle fundamentalmente, los sistemas o aparatos más afectados por esta enfermedad: Reproductor, Locomotor, Visual.

Como conclusión se puede decir que el presente trabajo demuestra que la detección de anticuerpos contra cepas rugosas de *Brucella canis*, mediante las pruebas RSAT, ME RSAT,

IDGA y IELISA en particular, permitieron detectar muchos animales sin manifestaciones clínicas ni subclínicas. A pesar que el hemocultivo es considerado la “técnica de oro”, para la confirmación indiscutible de la enfermedad, en todos los perros que resultaron serológicamente positivos a cuatro técnicas diferentes, el aislamiento fue negativo, posiblemente debido a la cronicidad de la enfermedad donde la bacteriemia es intermitente (Johnson and Walker, 1982; Carmichael and Greene, 2006) Por otro lado, la técnica de IELISA por ser una técnica más sensible, permitió detectar un mayor porcentaje de perros infectados, si bien presenta ventajas y desventajas para su implementación.

## ÍNDICE

Página

Resumen en español e inglés

Índice de tablas

Índice de figuras

Indice de graficos

Abreviaturas

### CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Conceptos generales

1.2 Situación en Argentina

1.3 Antecedentes de estudios realizados en la Provincia

1.4 Planteo del Problema

1.5 Importancia de la Investigación

### CAPÍTULO 2: MARCO TEORICO

2.1 Historia

2.2 Distribución Geográfica

2.3 Etiología

2.3.1 *Brucella* spp. Características generales

2.4 Epidemiologia

2.4.1 Brucelosis canina. Infección en el perro

2.4.2 Infección en el hombre

2.5 Patogenia

2.6 Signos Clínicos

2.6.1 Signos variables e inespecíficos

2.6.1.1 No reproductivos

2.6.1.2 Reproductivos

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Hallazgos de laboratorio clínico

2.7.2 Examen de eyaculado y semen

2.7.3 Pruebas serológicas

2.7.3.1 Prueba de aglutinación rápida en portaobjeto

2.7.3.2 Prueba de aglutinación en tubo de ensayo

2.7.3.3 Prueba de inmunodifusión en gel de agar

2.7.3.4 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

2.7.3.5 Aislamiento bacteriano

2.7.3.6 Cultivo en Laboratorio

- 2.7.3.7 Observación Microscópica
- 2.7.3.8 Detección genética
- 2.8 Hallazgos Patológicos
- 2.9 Tratamiento
  - 2.9.1 Animales reproductores
  - 2.9.2 Animales mascotas
  - 2.9.3 Infección ocular
  - 2.9.4 Meningoencefalitis
  - 2.9.5 Disco espondilitis
- 2.10 Prevención
- 2.11 Consideraciones de Salud Pública

### CAPÍTULO 3: HIPOTESIS Y OBJETIVOS

- 3.1 Hipotesis
- 3.2 Objetivos
  - 3.2.1 Objetivos generales
  - 3.2.1 Objetivos específicos

### CAPÍTULO 4: MATERIALES Y METODOS

- 4.1 Tipo de estudio
- 4.2 Área de estudio
- 4.3 Poblaciones bajo estudio
- 4.4 Encuesta Epidemiológica
- 4.5 Muestras de suero
- 4.6 Técnicas serológicas
- 4.7 Estudios Bacteriológicos. Hemocultivo
- 4.8 Análisis estadístico
- 4.9 Evaluación y seguimiento clínico

### CAPITULO 5: RESULTADOS

- 5.1 Variables fisiológicas
- 5.2. Pruebas serológicas y bacteriológicas
- 5.3 Aspectos clínicos y subclínicos
  - 5.3.1 Aspectos clínicos y subclínicos de los animales serológicamente positivos
  - 5.3.2 Presentacion del caso clínico

### CAPITULO 6: DESCRIPCION DE LA EXPERIENCIA DE LA TECNICA SEROLOGICA, ¡ELISA REALIZADA EN SENASA MARTINEZ BUENOS AIRES.

### CAPITULO 7: DISCUSION

CAPITULO 8: CONCLUSIONES

CAPITULO 9: RERERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla	Página
1. Especies de Brucella	
2. Variables fisiológicas vinculadas a la presentación de la enfermedad	
3. Tabla de frecuencia. Resultados de seropositividad a Brucella Canis obtenidos con diferentes técnicas diagnosticas	
4. Tabla que combina animales con signos clínicos al momento de la toma de muestra para serología, con el tipo de signos clínicos	
5. Tabla que combina animales confirmados, con el tipo de signos clínicos.	
6. Tabla que combina animales sospechosos, con el tipo de signos clínicos.	
7. Resultados de la técnica IELISA	

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura	Página
1: Modelo esquemático de la membrana externa de <i>Brucella</i> spp. en fase lisa.	
2: Imagen que muestra 10 ul de suero con 10 ul de Ag y la mezcla de ambos luego de la homogeneización.	
3: Técnica de Inmunodifusion en gel de agar (IDGA)	
4: El Ag (antígeno) reacciona con el C+ (control positivo) y con sueros positivos formando una línea de precipitina	
5: Caldo de cultivo con citrato para aislamiento bacteriano	
6: Cultivo en agar sangre y desarrollo de colonias de <i>Brucella canis</i>	
7: Antigeno de BPA y Aglutinoscopio	
8: Agar fraccionado en placas de Petri, solidificado y perforado con un sacabocado en forma de roseta	
9: Componentes del kit iELISA para <i>Brucella canis</i>	
10: Agregado de los constituyentes del kit y espectrofotómetro para la lectura de los resultados.	

### **INDICE DE GRAFICOS**

- 1: Distribucion por sexo de los 127 animales muestreados
- 2: Edad de los animales muestreados con y sin síntomas de Brucelosis
- 3: Distribucion por Raza de los 127 animales estudiados
- 4: Distribución de los canes según presencia o ausencia de propietarios responsables
- 5: Antecedentes de acceso a la calle de los animales bajo estudio
- 6: Presentacion de síntomas compatibles con Brucelosis al momento del relevamiento serológico de los animales bajo estudio.
- 7: Manifestaciones clínicas presentes en los 8 animales muestreados con sintomas compatibles con Brucelosis
- 8: Estado reproductivo de los animales muestreados
- 9: Tres categorías de animales muestreados
- 10: Resultados serológicos de los 127 caninos procesados con la técnica de RSAT
- 11: Resultados del ME-RSAT
- 12: Resultados serológicos procesados con la técnica de BPA
- 13 y 14: Distribucion de signos clínicos de las diferentes categorías de animales con serología positiva y numero de animales
- 15: Resultados serológicos de 45 caninos procesados mediante Ielisa

## **ABREVIATURAS**

ADN Ácido desoxirribonucleico  
BPA Prueba en placa con antígeno tamponado  
bv Biovar  
EDTA Ácido etilén diamino tetracético  
ELISA Enzimoimmunoensayo  
HS Extracto salino obtenido por calentamiento  
IDGA Inmunodifusión en gel de agar  
Ig Inmunoglobulina  
LPS Lipopolisacárido  
M Molar  
M (-) Cepa menos mucoide de *Brucella canis*  
mg Miligramo  
2ME 2-mercaptoetanol  
2ME- RSAT Aglutinación rápida en placa con el agregado de 2-mercaptoetanol  
min Minuto  
ml Mililitro  
mm milímetro  
ng Nanogramo  
μ Micrones  
μl Microlitro  
Omp Proteína de membrana externa  
PBS Buffer fosfato  
PC Proteína citoplasmática  
PCR Reacción en cadena de la polimerasa  
pi Post-infección  
R Cepa fenotipo rugoso  
rpm Revoluciones por minutos  
RSAT Aglutinación rápida en porta objeto  
S Cepa fenotipo liso  
UFC Unidades formadoras de colonias

## **CAPITULO I: INTRODUCCION**

### **1.1 Conceptos generales**

La brucelosis es una enfermedad bacteriana y se define como una antropozoonosis de distribución mundial. En perros, la causa principal de brucelosis es *Brucella canis*, un cocobacilo, gram negativo, inmóvil, intracelular facultativo, aerobio estricto (Greene y Carmichael, 2012; Hollett, 2006). De la misma manera que *Brucella ovis*, carece de la cadena “O” en el LPS, por lo que se clasifican como brucelas de “tipo rugoso” (Del Águila Padilla, 2007).

La infección natural puede ocurrir por vía vertical u horizontal, por contacto con mucosa oro-nasal, conjuntival, por ingesta de material placentario abortado, descargas genitales y durante el apareamiento (CSPH, 2007; Greene y Carmichael, 2012). Según Boeri *et al* (2008), la transmisión al hombre puede ser por contacto con el semen, orina y/o fetos abortados de animales infectados, lo que alerta sobre el peligro de contaminar el medioambiente.

Debido a que es una enfermedad zoonótica, la Brucelosis es una de las enfermedades más estudiadas, ya que existen muchas investigaciones y publicaciones referidas al conocimiento de la prevalencia y/o incidencia en los diferentes países y en las diferentes especies animales (Galvis Banegas, 2003; Chacon-Diaz *et al.* 2015; Greene y Carmichael, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la brucelosis dentro de la categoría de enfermedades infecciosas de origen bacteriano relacionadas con salud ocupacional y enfermedades de tipo profesional de notificación obligatoria:

Se ha descripto esta zoonosis en América (Canadá, Estados Unidos, México, América central, Brasil, Chile y Argentina), en algunos países europeos (España, Italia, Alemania, Gran Bretaña, Francia), África (Madagascar, Nigeria) y Asia (Túnez, Malasia, India, Corea, Japón, China). Nueva Zelanda y Australia parecen estar libres de este organismo (Gardner y Reichel, 1997).

### **1.2 Situación en Argentina**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ubica esta afección en cuarto lugar entre las enfermedades crónicas transmisibles de Argentina precedida por Tuberculosis, Chagas y Sífilis (Lavaroni *et al.*, 2011).

El primer informe positivo de esta enfermedad fue dado por Fernández Ithurrat en 1930, quien consiguió aislar la bacteria mediante hemocultivo en un enfermo de Mendoza (Ramacciotti, 1971), siendo *B. canis* aislada por primera vez en 1977 de una perra Dogo por hemocultivos y el primer caso documentado de *B. canis* en personas en 1979 (Varela Díaz y Meyers, 1979).

En el periodo 1996-2011 se identificaron y tipificaron más de 300 cepas de *B.canis* en el servicio de brucelosis del INEI-ANLIS en muestras de perros de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fé, Rio Negro, San Luis, San Juan y Tierra del Fuego, la mayoría con hábitos peri domiciliarios o vagabundos (Lucero, 2012).

La importancia de la brucelosis radica en la incidencia significativa en nuestro país ya que genera problemas médico-asistenciales, veterinarios, económicos y laborales (Lavaroni *et al.*, 2011), siendo una infección considerada de riesgo ocupacional, incluida en la lista de enfermedades profesionales desde 1932 (BEP, 2010).

El sistema nacional de vigilancia epidemiológica de la dirección de epidemiología del ministerio de salud pública, informa semanalmente los casos detectados por provincia y regiones sanitarias. Se controla en sangre a transfundir, siendo el centro nacional de redes de laboratorios (CNRL) de la administración nacional de laboratorios e institutos de salud (ANLIS) quien publica información sobre donantes reactivos detectados en bancos de sangre oficiales y privados de cada provincia (BEP, 2010).

### **1.3 Antecedentes de estudios realizados en la Provincia**

En la provincia de San Juan, las enfermedades endémicas presentan una gran subnotificación y no existen trabajos científicos realizados que describan la realidad epidemiológica de la Brucelosis canina y menos aún en el Departamento de Santa Lucia.

Existen casos clínicos confirmados en clínicas privadas, pero no se conoce la prevalencia real, ni las variables fisiológicas que condicionan la presencia de esta enfermedad en la provincia de San Juan.

### **1.4 Planteo del Problema**

La necesidad de realizar estudios de descripción y seguimiento de casos clínicos como de subclínicos, está basada en la necesidad de conocer el estado de circulación de brucelosis en la población hacia la cual se debe dirigir el esfuerzo sanitario y la situación epizootica, con el fin de poner en marcha programas adecuados para cada municipio o región (Iachini, 2012).

Existen diferentes motivos que subyacen al planteo del problema del presente trabajo, principalmente, que existen condiciones epidemiológicas en San Juan para que la Brucelosis se presente como enfermedad en caninos con potencial zoonótico, y puede estar subdiagnosticada por la falta de manifestaciones clínicas específicas, o en muchos casos, porque la gente no consulta a los Médicos Veterinarios.

### **1.5 Importancia de la Investigación**

En primer lugar, es fundamental conocer el rol que los caninos pueden jugar en la cadena epidemiológica de la Brucelosis como enfermedad zoonótica, sobre todo por la estrecha relación de convivencia con el hombre (Tuemmers *et al.* 2011; Boeri *et al.*, 2008; Chassagnade *et al.*, 2008).

Por otra parte, debido al desconocimiento de la enfermedad por parte de los propietarios y la dificultad para realizar el diagnóstico de certeza de brucelosis en algunas etapas de la enfermedad, se subestiman muchos casos en etapas tempranas y en portadores crónicos, por lo que esta zoonosis representa un problema de Salud Pública mundial, ya que, según la OMS, cada año se registra medio millón de nuevos casos de brucelosis (por distintas especies patógenas) en el mundo (Obregon Fuentes, 2017).

Sumado a lo anterior, algunos investigadores aún no han logrado un tratamiento eficaz, ni una vacuna protectora y por la prolongada permanencia de las bacterias en los animales afectados (circunstancias que potencian de modo considerable el contagio), la identificación y registro de un animal portador o enfermo de Brucelosis no solo es pertinente sino fundamentalmente necesario para evitar la transmisión al hombre

Es importante establecer medidas profilácticas para los animales y personas, a partir del estudio de frecuencia de presentación y de casos clínicos (caracterización de la enfermedad), aportados por colegas de la provincia de San Juan y aquellos que surjan del muestreo del Departamento de Santa Lucía. Es decir, indicar la necesidad de un examen detallado y sistemático en los casos confirmados, realizar una evaluación y seguimiento clínico de aquellos sistemas orgánicos que más se afectan en esta enfermedad (reproductor, locomotor, visual) para indicar acciones preventivas.

Sin brucelosis animal no existe la enfermedad humana, por lo tanto, el ~~control~~ diagnóstico de la infección en los animales por detección serológica y la identificación de animales sospechosos, probables y confirmados, constituye un aporte fundamental para realizar las intervenciones de control que correspondan.

Consecuentemente, a partir de los datos que se obtengan de esta investigación, se busca aportar información científica y de relevancia práctica, tanto para propietarios de animales, para los colegas de la actividad privada y fundamentalmente para el Ministerio de Salud Pública, Departamento de Zoonosis, de la Provincia de San Juan.

## **CAPITULO 2: MARCO TEORICO**

La Brucelosis es una enfermedad contagiosa, zoonótica, de distribución mundial, de curso crónico, causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta principalmente al ganado bovino, porcino, ovino, caprino, a los caninos y circunstancialmente al hombre (Ministerio de Salud, 2013; Álvarez Hernandez *et al.* 2015).

Se caracteriza por presentar abortos en hembras y en menor grado, orquitis, epididimitis e infección de las glándulas sexuales accesorias en el macho (Greene y Carmichael, 2012).

### **2.1 Historia**

Haciendo una revisión de la historia de la medicina, algunos autores consideraron que la brucelosis era una enfermedad conocida desde los años 400 a.C., pero las primeras descripciones en las que se presentaba con claridad, son las de Cleghorn en 1551.

En 1861, Marston contrajo una enfermedad febril en la zona del mediterráneo y la descripción de su propio padecimiento hace suponer; casi con certeza que estaba sufriendo Brucelosis, una enfermedad prevaeciente en la isla de Malta, tomando el nombre “fiebre de Malta”.

En 1887, Bruce aisló un organismo gram negativo de los soldados británicos que se encontraban en Malta, más tarde denominado *Micrococcus melitensis*.

En 1897 Hughes, propuso el nombre de Fiebre Ondulante y aisló un bacilo de vacas que abortaban y lo denominó *Bacillus abortus*.

En 1920, Meyer y Show, crearon el género *Brucella*, que incluía dos especies: *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* y años más tarde se anexó *Brucella suis* (Pérez Sancho, 2014)

*Brucella ovis*, fue aislada por primera vez en 1956, a partir de ovejas abortadas (Álvarez Hernández *et al.* 2015)

En 1957 Stoenner y Lackman aislaron la quinta especie de este género de la rata selvática del desierto *Neotomae lepidae* en el Oeste de EEUU, que se denominó *Brucella neotomae*. (Suarez Ezquivel *et al* 2017).

*Brucella canis*, fue identificada en Estados Unidos en 1967 por Carmichael como agente etiológico del aborto contagioso de los perros (Ramasiotti, 1976) (Carmichael y Shin, 1999).

*Brucella suis*, fue descubierta por primera vez por Traum en 1914 (Castro Flores y Carmichael, 2012).

Recientemente, han sido identificadas nuevas especies: *B. pinnipedialis*, *B. ceti* (Guzman Hernández *et al*, 2016), aisladas de cetáceos, pinnípedos y focas., *B. microti* en Checoslovaquia (Schollz *et al.*, 2008) aislada de zorros y *B. inopinata* aislada de una infección de un implante mamario. (Scholz *et al.*, 2010)

## **2.2 Distribución Geográfica**

La distribución de las diferentes especies de *Brucella* y sus biotipos presenta variaciones geográficas.

*B. abortus* es la más ampliamente difundida; *B. melitensis* y *B. suis* tienen una distribución irregular, *B. ovis* también tiene una distribución mundial, pero principalmente se la encuentra donde la cría de ovinos es importante, finalmente la distribución de *B. neotomae* se limita a los focos naturales (Acha *et al.* 1986)

*B. canis* tiene una distribución universal; actualmente se conoce que está presente en muchos países de varios continentes. Se han realizados numerosos estudios sobre la presencia de la infección por *B. canis* en los Estados Unidos (Sanchez Jimenez, M. *et al.* 2013).

A partir de estos hallazgos la enfermedad ha sido notificada en países de América Central, América del Sur, Europa, Asia y África (Flores Castro, 1981; Wanke, 2004). Algunos países del centro y norte de Europa han conseguido erradicar la brucelosis, pero permanece como un problema en regiones mediterráneas como en Asia, algunas zonas de África y América Latina.

En nuestro país, el primer aislamiento de *B. canis* fue realizado en 1977 en la provincia de Córdoba, a partir de sangre de una perra de raza Boxer (Ramacciotti, 1978), también se aisló el agente causal de la enfermedad en la Provincia de Buenos Aires, en la ciudad de

General Pico, Provincia de La Pampa (Baruta, *et al* 2003), Córdoba y San Luis (Lucero, 2004).

## 2.3 Etiología

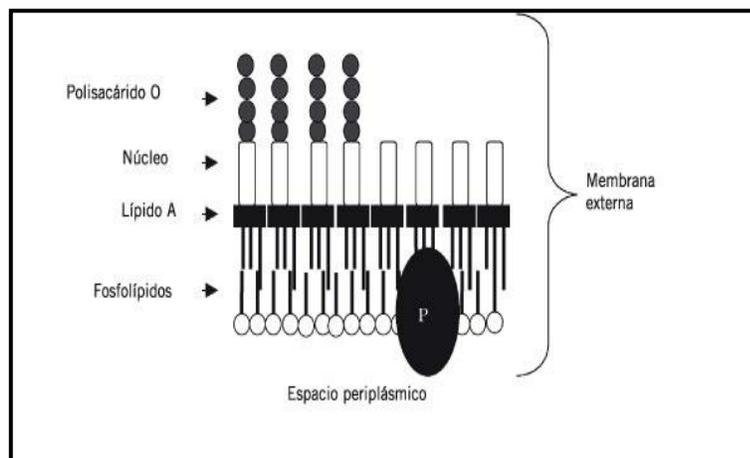
### 2.3.1 *Brucella* spp.

#### Características generales

El género *Brucella* corresponde a cocobacilos gram negativos, intracelulares facultativos, aerobios estrictos, inmóviles, sin cápsula y no esporulado. Son pequeños (de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 0,5 a 0,15  $\mu\text{m}$  de largo).

La temperatura óptima de crecimiento, el cual es lento, es de 37°C, con PH entre 6,6 y 7,4, requiere un medio rico para su desarrollo como el agar sangre, agar tripticasa soya, agar *Brucella* o agar suero-dextrosa. Aunque el crecimiento de las brucellas se da generalmente en los primeros 3 a 4 días, los cultivos deben guardarse por 30 días antes de ser descartados como negativos. No requiere suero ni CO<sub>2</sub> para el crecimiento, no produce H<sub>2</sub>S, son catalasa, oxidasa y ureasa positivo y no fermentan los azúcares. Se presentan aislados o en cadenas cortas, no son ácidos resistentes (Joklik, 1997; Ardoino, 2006; BEP, 2010; Soloaga *et al*, 2004).

Posee antígenos citoplasmáticos y de pared celular. Las cepas rugosas carecen del antígeno “O” del LPS, presente en cepas lisas (Figura 1)



**Figura 1: Modelo esquemático de la membrana externa de *Brucella* spp. en fase lisa.**

Las reacciones cruzadas serológicas observadas entre especies de *Brucella* y *Yersinia*, *franciscella tularensis*, *Vibrio cholerae* y *salmonela*, se atribuyen a similitudes de las cadenas laterales O-específicas de los residuos polisacáridos de estos microorganismos (BEP, 2010).

Actualmente se reconocen nueve especies en el género *Brucella*. *B. melitensis*, es la especie más importante por ser altamente nociva, posee tres biotipos y afecta principalmente a caprinos y ovinos; *B. ovis*, llamada así porque sólo infecta ovinos; *B. abortus*, que tiene nueve biotipos y es capaz de propagarse en bovinos, búfalos y visón; *B. suis*, que tiene una amplia especificidad (liebres, reno, caribú y roedores) puesto que tiene 5 biovares sin embargo, su principal hospedero es el porcino; *B. canis*, es principalmente patógena en caninos; *B. neotomae*, que es especie específica de roedores, *B. microti*, se le atribuye la enfermedad en el zorro rojo y ratón de campo, *B. ceti*, que se puede transmitir a cetáceos (ballenas, marsopas y delfines) y, por último, *B. pinnipedialis*, para las cepas de pinnípedos como focas, elefantes marinos y morsas (Tuemmers *et al.* 2011)

De las nueve especies, cuatro pueden ser patógenas para el ser humano. *B. melitensis*, es la más agresiva, luego le siguen *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*. La brucelosis, causada específicamente por *B. canis*, es una zoonosis poco frecuente (Tuemmers *et al.* 2011)

En la última década se han reconocido nuevas especies aisladas de animales terrestres y marítimos como *B. pinnipedalis* (focas), *B. ceti* (ballenas y delfines), *B. microti* (roedor) y otras como *B. inopinata* (Implante mamario humano) (Zárate *et al.*, 2014).

Cada una de las especies del género *Brucella* son capaces de infectar a una variedad de mamíferos, pero tienen preferencia de huésped: *B. abortus* (Bovinos), *canis* (perros), *mellitensis* (cabras-ovejas), *ovis* (ovejas), *neotomae* (roedores) y *suis* (cerdos) (Greene y Carmichael, 2012; BEP, 2010, Vega Lopez 2008) (Tabla 1)

*B. mellitensis*: aerobio, posee en general un antígeno “M” predominante, generalmente patógeno para los caprinos y ovinos; pero puede infectar a otras especies, entre ellos los bovinos y el hombre. La cepa de referencia FAO/OMS, 1972 es *Brucella melitensis* 16 M, se reconocen 3 biotipos.

*B. abortus*: posee en general un antígeno “A” predominante, en general es patógeno para los bovinos, pero puede también infectar a otras especies, entre ellos el hombre. Cepa biotipo de referencia FAO/OMS, 1972 es *B. abortus* 544. Se reconocen nueve biotipos.

*B. canis* aerobio, no poseen los antígenos “A” y “M”, de las brucelas lisas, cepa de referencia RM 6/66 (FAO/OMS, 1972).

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-). Estudios realizados en perros beagles indican que las variantes (M-) tienen una virulencia reducida, ya que los animales se mantienen asintomáticos, a pesar de la inoculación de éstas por diversas vías, como así tampoco se produce aborto o epididimitis. La respuesta inmune evaluada por test de aglutinación es mucho más débil, especialmente si se utiliza como antígeno (Ag) *B. ovis* (Carmichael *et al.*, 1984).

*B. canis* vive relativamente poco tiempo fuera del perro y se inactiva fácilmente con desinfectantes comunes (Greene y Carmichael, 2012).

**Tabla 1.** Especies de *Brucella*<sup>1</sup> (modificado).

Especie	Biovars	Hospedero	Nivel de patogenicidad para los humanos
<i>B. melitensis</i>	1-3	ovejas, cabras	Alta
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	ganado	Alta
<i>B. suis</i>	1, 3	cerdo	Alta
	4	renos, caribú	Alta
<i>B. canis</i>	-	perros	Moderada
<i>B. inopinata</i>	-	desconocido	Alta

(Mendez, 2013)

## 2.4 Epidemiología

### 2.4.1 Brucelosis canina. Infección en el perro

Estudios serológicos demuestran que la infección ocurre tanto en perros de criaderos como en perros callejeros (Castro *et al.* 2005; CSPH, 2007; Greene y Carmichael, 2012). La determinación de seroprevalencia se ve influenciada en gran medida por los métodos empleados para estas pruebas y su interpretación (Greene y Carmichael, 2012).

Solamente perros y canidos salvajes son susceptibles de ser infectados por *B. canis* y son considerados los únicos huéspedes verdaderos, en ellos la causa principal de brucelosis es *Brucella canis*, ocasionalmente se asocia a otras especies de brucelas con la enfermedad en perros, entre ellas *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (Molina *et al.* 2014), incluso las cepas de

vacunas atenuadas de *B.abortus* pueden infectar a perros (Hollett, 2006; Greene y Carmichael, 2012; Eiras, 2014; Di Lorenzo, 2012).

La enfermedad producida por *B. canis* ha sido reconocida principalmente en el canino y ocasionalmente en el hombre, pero sólo el perro puede transmitir la infección. La edad, las condiciones de alojamiento, la raza y la ubicación geográfica del animal, determinan la prevalencia de la infección en los perros.

La infección puede transmitirse en forma horizontal o vertical. En los perros se presenta por la ingestión de material infeccioso procedente de animales domésticos y salvajes. En lobos y zorros, también puede presentarse al ingerir carne contaminada. La infección por heridas cutáneas tiene poca importancia epidemiológica.

La transmisión natural sobre todo de cepas lisas, ocurre por contacto directo con descargas vaginales infectadas, fetos abortados o después de ingerir placentas contaminadas. Los caninos infectados transmiten la enfermedad a las perras, durante la copula mediante semen u orina por largos periodos de tiempo (Greene y Carmichael, 2012). La fuente de infección la constituyen principalmente los animales infectados que excretan bacterias, contaminando de esta forma el medio ambiente (Ardoino, 2006; Sanmartino *et al.*, 2013)

La dosis mínima infecciosa por via oral en perros es de aproximadamente  $10^6$  bacterias/ml y por via conjuntival de  $10^4$ - $10^5$  bacterias/ml. Las descargas vaginales y el semen son las muestras que mayor concentración de microorganismos contienen (Greene y Carmichael, 2012; IT02/2013).

Las perras infectadas eliminan *B. canis* durante el estro, la reproducción o después de un aborto. Es más común la transmisión por contacto oronasal con materiales abortados porque contienen hasta  $10^{10}$  bacterias/ml. Es posible que ocurra liberación de *B. canis* por periodos de hasta 6 semanas después de un aborto. La leche de perras infectadas contiene concentraciones inferiores de organismos y parece que es menos importante en la transmisión de la infección a los cachorros que sobreviven; la mayoría ya se infectó en útero o en forma congénita (Greene y Carmichael, 2012; BEP, 2010; Kiener, 2014).

Los machos liberan este microorganismo por orina y líquido seminal. Las brucelas localizadas en próstata y epidídimo, están estrechamente vinculadas con vejiga urinaria (Ramírez López, 2005; Greene y Carmichael, 2012; IT02/2013). En general, la frecuencia de alojamiento de *B. canis* en semen de perros infectados es alta durante las primeras 6 a 8 semanas post inoculación (PI). Algunos autores observaron liberación intermitente del agente

infeccioso en bajas cantidades hasta las 60 semanas PI e incluso puede continuar eliminándose durante dos años (Ardoino, 2006; Greene y Carmichael, 2012).

La transmisión venérea es una de las formas de contagio entre perros sexualmente maduros, mientras que, en los sexualmente inmaduros, la transmisión extrauterina se realiza fundamentalmente por vía oronasal. La transmisión social ocasional es una vía de contagio frecuente ya que el olfateo y lamido de los genitales representan una forma de comunicación canina (Di Lorenzo, 2012). Puede transmitirse *B. canis* de perros infectados maduros a perros no infectados después de varias semanas o meses de contacto cercano (Kiener, 2014).

La excreción urinaria comienza de una a tres semanas de establecida la bacteriemia y puede durar hasta más de un año.

Siguiendo la exposición experimental a *Brucella canis*, los perros desarrollan bacteremia en una a tres semanas, en algunos animales los microorganismos se localizan en el bazo, nódulos linfáticos, hígado por lo menos un año, manteniendo niveles muy altos de anticuerpos a lo largo de todo el periodo de bacteremia y declinando en aquellos perros que se negativizan al hemocultivo (Jones *et al.*, 1968)

#### **2.4.2 Infección en el hombre:**

El hombre parece tener un grado considerable de resistencia natural a la infección por *B. canis* y los casos reportados son generalmente debidos a exposiciones de laboratorio o por contacto directo con perros infectados (Stoenner y Kaplan, 1979).

La transmisión ocurre generalmente a través de la manipulación de muestras contaminadas y las manos contaminadas tienen contacto con la boca o los ojos (Lucero, 2012; Di Lorenzo, 2012; Schiaffino, 2012; Kiener, 2014).

También se cree que la infección en el ser humano ocurre por contaminación de heridas abiertas o mucosas, en las cuales se deposita material infeccioso, por ejemplo, orina o tejidos abortados (FAO/OMS., 1972).

La infección por contacto, es especialmente frecuente en veterinarios, agricultores, personal de mataderos y fábricas de embutidos, encargados de establecimientos que se ocupan de los animales y personal de laboratorio. El peligro de infección por contacto, es particularmente grande en la época en la que se produzcan los abortos, principalmente por contaminación masiva de las instalaciones. La infección puede transmitirse también por

inhalación de sustancias desecadas de origen animal, como el polvo de la lana (FAO/OMS, 1972).

## **2.5 Patogenia**

La enfermedad comienza con la penetración de la bacteria a través de una membrana mucosa, ya sea oral, nasal, conjuntival o genital y luego es fagocitada por los macrófagos, donde sobrevive y se multiplica. Esta bacteria tiene la capacidad de inhibir la formación del complejo fagolisosoma, con lo cual impiden la actuación de las enzimas lisosomales (Wanke *et al.* 2004).

Se estima que el período de incubación dura de 2 a 4 semanas, pero eventualmente puede ser de hasta 6 semanas. La infección general, primeramente, cursa sin síntomas clínicos (Castro *et al.* 2005; Ardoino, 2006; Greene y Carmichael, 2012).

Posteriormente las brucelas invaden los ganglios linfáticos regionales. A partir de ellos, se propaga vía hematogena y linfática a diferentes tejidos. La bacteriemia se produce entre 1 a 4 semanas post infección y puede mantenerse en forma intermitente o continuar hasta 64 meses (Shin y Carmichael, 1999). Durante ese período la bacteria coloniza órganos como el hígado, bazo, próstata y epidídimo, en los cuales genera un infiltrado de células inflamatorias (Borie *et al.*, 2002).

El agente infeccioso se multiplica preferentemente en las mamas, donde forma nódulos que pueden persistir durante varios años. Si el animal es gestante, los microorganismos se multiplican, se albergan y crecen sobre todo en las envolturas fetales, en el feto, mucosa uterina y en las mamas. No obstante, puede estar libre de gérmenes durante la gestación y en el parto y periodo puerperal, las bacterias emigran también allí, para desaparecer cuando el útero involuciona. Pueden observarse focos brucelócicos del útero, que sólo tienen carácter periódico, los de la mama, son más duraderos. El útero no es un sitio preferencial para la replicación en hembras no grávidas o diestruales (Greene y Carmichael, 2012).

*Brucella* tiene especial afinidad por los órganos del sistema retículo endotelial, donde se localiza intracelularmente, evadiendo así la respuesta humoral y celular (Ardoino, 2006; Castro *et al.* 2005). Produce hiperplasia linforeticular generalizada e hiperglobulinemia durante el curso de la infección (Borie *et al.*, 2002; Greene y Carmichael, 2012). *B. canis*, también puede localizarse en ojo, riñón, meninges, disco intervertebral (Hollet, 2006; Greene y Carmichael, 2012).

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, esta característica de la bacteria hace que los antibióticos resulten muchas veces ineficaces, como así también los

mecanismos de defensa del cuerpo dependientes de anticuerpos, esto justifica la naturaleza crónica de la infección, ya que son capaces de adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células eucariotas tanto fagocíticas como no fagocíticas (Castro *et al.* 2005; IT02/2013; Ruiz, 2014).

La inflamación de epidídimo en machos provoca pérdida de esperma, lo que induce al sistema inmune a producir un complejo de anticuerpos (Ac) aglutinantes anti-esperma. Las respuestas inmunes contra espermatozoides contribuyen a la epididimitis e infertilidad que se observa en la mayoría de los perros infectados (Hollet, 2006; Greene y Carmichael, 2012).

Al igual que con otros parásitos intracelulares, es probable que la inmunidad mediada por células sea el mecanismo de defensa más importante contra *B. canis*. Títulos persistentes de anticuerpos no protectores son característicos de este tipo de infecciones y parecen ejercer poca influencia sobre el nivel de bacteriemia o la cantidad de microorganismos en los tejidos. Los perros que se recuperan de forma natural presentan títulos de aglutinación negativos o bajos y aun así son inmunes a la reinfección, sugiriendo que la inmunidad protectora esta mediada por células. A pesar de su persistencia en tejidos, los títulos mediante aglutinación sérica disminuyen cuando ya no se detecta *B. canis* en la sangre (Hollet, 2006; Greene y Carmichael, 2012).

La recuperación natural de la infección por *B. canis* parece ser un requisito para mantener inmunidad protectora (Greene y Carmichael, 2012).

## **2.6 Signos Clínicos**

Cuando nos enfrentamos a un paciente febril con signos y síntomas de origen desconocido, presentación clínica confusa y antecedente de contacto con perros, brucelosis debe ser considerada como diagnostico presuntivo. Existe un amplio espectro de signos y síntomas detectado en pacientes infectados por *B. canis*, lo que dificulta el diagnóstico clínico (Wanke *et al.* 2008; Lucero, 2012; Eiras, 2014).

### **2.6.1 Signos variables e inespecíficos**

#### **2.6.1.1 Signos no reproductivos**

Fiebre de origen desconocido, debilidad, linfadenopatía generalizada, atrofia muscular, letargo, pérdida de peso y condición corporal, apatía, disminución o pérdida de la libido, envejecimiento prematuro, pelaje hirsuto, perdida de vigor, disminución de la tolerancia al ejercicio, e incluso disnea, ortopnea y edema de miembros inferiores producto de una

endocarditis infecciosa, son ocasionados por *B. canis*. Esta última localización es la principal causa de mortalidad pues en un 82% de los casos, se ve afectada principalmente la válvula aórtica. Las lesiones oculares incluyen uveítis anterior, hipema, desprendimiento de retina, coriorretinitis, nubosidad en humor vítreo por neuritis óptica, enoftalmitis con glaucoma secundario y edema corneal con opacificación (Greene y Carmichael, 2012)

En el tejido retículo endotelial se presenta hepatomegalia y esplenomegalia y en el sistema osteoarticular, discoespondilitis, artritis y artralgia (Tuemmers *et al.* 2011). Si se desarrolla compresión de la medula espinal con discoespondilitis, los pacientes experimentan al principio dolor espinal y posteriormente paresia y ataxia. Es común la reaparición de episodios hiperestésicos en perros con discoespondilitis por brucelosis canina. La osteomielitis o poliartitis del esqueleto apendicular provoca cojera del miembro afectado (Greene y Carmichael, 2012). Es poco habitual que los perros enfermen gravemente (Greene y Carmichael, 2012).

#### **2.6.1.2 Signos reproductivos**

##### **En hembras**

La infección por *B. Canis* no interfiere con los ciclos estrales normales. Las perras abortan sus cachorros generalmente en el último tercio de la gestación, a veces sin demostrar otros signos clínicos (a veces pueden no observarse los abortos porque la perra ingirió los fetos). El aborto va acompañado por una descarga vaginal de color marrón o gris verdoso que dura de 1 a 6 semanas. Debe sospecharse brucelosis siempre que perras aparentemente sanas aborten ya que es la presentación más frecuente de la enfermedad (Wanke *et al.*, 2008; Boeri *et al.* 2008; Greene y Carmichael, 2012). Algunas perras que abortan pueden tener camadas normales posteriormente y otras experimentar problemas reproductivos intermitentes (Greene y Carmichael, 2012), además pueden ocurrir fallas en la concepción, muerte embrionaria precoz o nacimiento de cachorros débiles que mueren a los pocos días de vida (Sanmartino *et al.*, 2013; Zárata *et al.*, 2014).

En ocasiones los abortos (con expulsión o reabsorción) suelen no detectarse y al pasar desapercibidos, el propietario solo nota falla en la concepción. En otras ocasiones la gestación llega a término y pueden nacer tanto cachorros vivos como muertos. Los cachorros que sobreviven o se infectan cuando son neonatos suelen presentar linfadenomegalia periférica generalizada hasta que alcanzan la madurez sexual. Este cachorro presenta hiperglobulinemia persistente y pueden presentar fiebre transitoria, leucocitosis o convulsiones como manifestaciones sistémicas de la infección (Ardoino, 2006; Greene y Carmichael, 2012). Los neonatos pueden adquirir la infección en el útero o al nacer (Sanmartino *et al.*, 2013).

## **En machos**

Signos frecuentes son epididimitis, orquitis, infertilidad, dermatitis escrotal, prostatitis. En casos crónicos suele haber atrofia testicular (Sanmartino *et al.*, 2013; Zárate *et al.*, 2014).

La tumefacción testicular es generalmente por agrandamiento de la cola del epidídimo, menos frecuente por orquitis y agrandamiento testicular primario ya que machos infectados en forma crónica suelen desarrollar atrofia testicular unilateral o bilateral. La reducción del desempeño reproductivo masculino suele ser menos advertida, sin embargo, ocurre infertilidad. Los machos parecen tener buen estado de salud, pero presentan un escroto agrandado debido a la acumulación de líquido serosanguinolento en la túnica. La dermatitis escrotal es el resultado del constante lamido y de la infección secundaria con estafilococos no hemolíticos. Es común hallar anormalidades en semen y eyaculado sin pérdida de la libido (Angrimani *et al.*, 2016; Greene y Carmichael, 2012).

La forma en que cursa la infección depende de la virulencia y de la cantidad de gérmenes, así como de la sensibilidad del animal. Por ello el proceso del curso puede ser muy diferente. Además, puede presentarse de forma subclínica o crónica, debido a la capacidad de *B. canis* de evadir los mecanismos de defensa del hésped y permanecer en forma intracelular en los tejidos por un largo tiempo (Greene y Carmichael, 2012). Otra forma de presentación es asintomática durante todo el transcurso de la infección (Tuemmers *et al.*, 2011)

La recuperación espontánea de la infección puede ocurrir dentro de 1 a más de 5 años PI (Hollet, 2006).

## **2.7 Diagnóstico**

Las infecciones no serán diagnosticadas por anamnesis de rutina o examen físico exclusivamente. En la literatura médica se describen métodos que se enfocan principalmente al diagnóstico del género *Brucella* para posteriormente identificar la especie a través de PCR y ELISA principalmente, debido a que son las técnicas de mayor especificidad y sensibilidad (Greene y Carmichael, 2012).

### **2.7.1 Hallazgos de laboratorio clínico**

La bioquímica sanguínea y la hematología no muestran ningún valor alterado o no son específicos de la enfermedad. Solamente se observa en la presentación crónica hiperglobulinemia (beta y gamma) con hipoalbuminemia. En el urianálisis hay presencia variable de bacteriuria. (Greene y Carmichael, 2012).

En presencia de discoespondilitis la arquitectura vertebral en general se preserva en los estudios radiográficos y es típica la participación mínima de tejido blando espinal adyacente (Queiroz de Oliveira, 2008).

### **2.7.2 Examen de eyaculado y semen**

Las manifestaciones más frecuentes de presentación son eyaculados con semen sanguinolento, disminuido o ausente. Puede haber azoospermia o baja concentración y motilidad en los espermatozoides. Dichas anormalidades son evidentes en la quinta semana PI y más pronunciadas en la octava e incluyen espermatozoides inmaduros, acrosomas deformados, partes intermedias tumefactas, colas enrolladas, aglutinación entre cabezas, gotas citoplasmáticas retenidas.

Agregados grandes de células inflamatorias, en general formadas por neutrófilos, rodean los macrófagos adherentes que contienen el esperma fagocitado. Más del 90% del esperma es anormal en la 20 semana PI. En plasma seminal se encontró anticuerpos antiespermatozoides. La aspermia sin células inflamatorias se corresponde con el desarrollo de atrofia testicular bilateral (Angrimani *et al.*, 2016; Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008).

### **2.7.3 Pruebas serológicas**

Los métodos serológicos prueban indirectamente la presencia del microorganismo (Ardoino, 2006; BEP, 2010), a pesar de eso, la serología es el método diagnóstico más utilizado para detectar brucelosis canina debido a la facilidad de ejecución, rapidez de procesamiento y posibilidad de realizar un gran número de muestras (Queiroz de Oliveira, 2008).

A partir de las dos semanas luego que se ha producido la infección, los anticuerpos se hacen detectables (Johnson *et al.*, 1983). La respuesta inmune es más débil y de menor duración con la exposición a cepas (M-) que con la exposición a cepas de campo (M+) en los tests de aglutinación, especialmente cuando se usa como antígeno *B. ovis* (Carmichael *et al.*, 1989).

Pese a la presencia de bacteriemia 2 semanas PI, resultados de pruebas serológicas frecuentemente son negativos en las primeras 3 a 4 semanas PI ya que *B. canis* induce producción de anticuerpos detectables por diferentes pruebas serológicas a partir de las 8 a 12 semanas PI. En forma similar a todas las infecciones por *Brucella*, en la primera fase de la respuesta inmune predomina IgM, que va siendo paulatinamente superada por IgG

caracterizando la cronicidad del proceso (Miranda y Báez, 2005; Greene y Carmichael, 2012).

El diagnóstico de laboratorio de brucelosis canina incluye: Prueba de aglutinación rápida en portaobjeto (RSAT), prueba de aglutinación en tubo de ensayo (PAT) y prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Estas tres pruebas tienen menor especificidad debido a que los antígenos de superficie de brucelas rugosas reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos producidos por otras especies de bacterias no patógenas (Shin y Carmichael, 1999).

Debido a esto se han mejorado técnicas:

- Una prueba RSAT utilizando antígeno (M-) de *B. canis*, en reemplazo del antígeno de *B. ovis*, reduce la tasa de falsos positivos a un 10%, ya que teñido con Rosa de Bengala es levemente más sensible que los antígenos comerciales de *B. ovis*. El suero problema debe tratarse primero durante 1 minuto con 2 Mercaptoetanol (Carmichael y Joubert, 1987).
- En la prueba de IDGA, la modificación tendiente a disminuir los falsos positivos, consiste en utilizar un complejo antigénico con al menos 3 antígenos (proteínicos citoplasmáticos) incluyendo el 2-R, el cual no está presente en ninguna otra bacteria gram negativo. Al igual que en la técnica anterior el suero problema debe tratarse primero durante 1 minuto con 2 Mercaptoetanol (Carmichael *et al*, 1984).
- 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 curso clínico del animal (Serikawa *et al.*, 1989; Lucero *et al*, 2002).
- También se puede utilizar como antígeno un lipopolisacárido rugoso (RLPS) obtenido de un cultivo de *B. canis*, lográndose en este caso una especificidad del 98,8% y sensibilidad del 95,8% (Nielsen *et al*, 2004).

Todas las pruebas, salvo el método de IDGA-AgPC, miden los anticuerpos contra antígenos de LPS y pueden arrojar resultados erróneos (Greene y Carmichael, 2012), por lo tanto, se debe tener mucha cautela al momento de interpretar los resultados serológicos, (Castro Flores y Carmichael, 2012) ya que los mismos pueden dar resultados falsos positivos debido a la reacción cruzada entre varias especies de bacterias, con el antígeno lipopolisacárido (LPS) de *B. canis* y resultados negativos en casos crónicos (Del Águila Padilla, 2007).

En algunos perros, los títulos serológicos pueden permanecer positivos hasta 36 meses después de que la bacteriemia ha cesado. Es posible que perras con infección crónica presenten títulos de anticuerpos ambiguos desde el punto de vista del diagnóstico y cultivos sanguíneos negativos. En hembras se desarrolla recrudescimiento de la bacteriemia y aumento de títulos de anticuerpos durante el proestro, estro, preñez o aborto, siendo estos los momentos más confiables para evaluar perras en busca de infección (Greene y Carmichael, 2012).

Probablemente los machos alojen organismos en próstata y epidídimos por largos periodos después que la bacteriemia ha cesado y los títulos de aglutinación han disminuido (Greene y Carmichael, 2012).

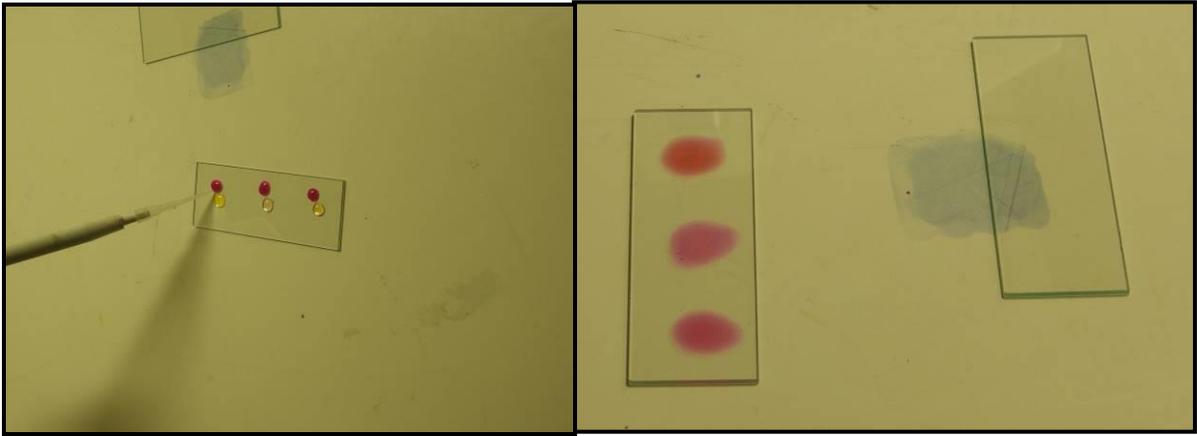
El tratamiento antibiótico puede suprimir la bacteriemia y la respuesta serológica asociada, contribuyendo a la serología falsa negativa y que no se logre el aislamiento del organismo a partir de perros infectados. No deben administrarse antibacterianos hasta no haber completado las pruebas diagnósticas (Greene y Carmichael, 2012).

Deben evaluarse las pruebas serológicas de acuerdo a los hallazgos clínicos encontrados. Un título alto de aglutinación a *B. canis* generalmente indica infección activa, pero debe confirmarse mediante pruebas adicionales. Títulos bajos o intermedios pueden significar enfermedad previa o infección muy reciente, y deben repetirse las pruebas o debe intentarse aislar el microorganismo mediante hemocultivo.

Los perros asintomáticos que presentan resultados positivos en pruebas de aglutinación nunca deben ser considerados infectados hasta que los resultados de los cultivos sanguíneos o los resultados más específicos hayan confirmado los hallazgos positivos, recomendando a los 30 días repetir el diagnóstico y recurrir como confirmatorio al aislamiento del agente causal por hemocultivo (Miranda y Báez, 2005; Greene y Carmichael, 2012).

### **2.7.3.1 Prueba de aglutinación rápida en portaobjeto (RSAT)**

Esta técnica consiste en mezclar 10 µl de suero con 10 µl de antígeno, sobre un portaobjeto de 75 x 25 mm luego se realizan movimientos de rotación durante 2 minutos (Fig 2), y se procede a la lectura en un microscopio óptico a 10X. Según el grado de aglutinación de las muestras positivas los resultados se clasifican de una a cuatro cruces: +: Muy débil positivo. ++: Débil positivo. +++: Moderadamente positivo. ++++: Fuertemente positivo. Se consideran muestras negativas a aquellas en que la mezcla suero-antígeno no reveló aglutinación.



**Figura 2: Imagen que muestra 10 ul de suero con 10 ul de Ag y la mezcla de ambos luego de la homogeneización.**

Según Miranda y Báez, 2005; Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012, se recomienda la utilización de la prueba de aglutinación rápida en portaobjetos con 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT) como técnica de rutina, ya que tiene como ventajas ser económica, rápida, sensible, sencilla y también detecta anticuerpos en forma temprana.

Se puede usar tanto el antígeno de pared celular de *B. canis* como el de *B. ovis* para el diagnóstico la brucelosis canina, ya que este último reacciona en forma cruzada con el antígeno lipopolisacárido (LPS) de *B. canis*. Esta cepa rugosa reacciona en forma cruzada con otras especies bacterianas como cepas mucoides de *Pseudomonas*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus equuli*, sin embargo, la mayoría de las causas de reacciones cruzadas no han sido identificadas (Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012).

La técnica 2ME-RSAT reduce en forma sustancial las reacciones falsas positivas mediante la eliminación de anticuerpos IgM que reaccionan en forma menos específica, detectando únicamente IgG, aumentando con ello la especificidad de la prueba. Se debe tener en cuenta que al inicio de la infección solo se originan anticuerpos IgM, por lo que la prueba con 2-ME puede ser negativa. Esta prueba proporciona resultados positivos después de 3-4 semanas PI hasta que el animal ya no posee bacteriemia (Queiroz de Oliveira, 2008; Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012).

### **2.7.3.2 Prueba de aglutinación en tubo de ensayo (PAT)**

Esta prueba es considerada como prueba básica en programas de control y erradicación, ya que tiene como ventajas su fácil ejecución, resultados uniformes, economía

y estandarización a nivel internacional. Sus desventajas son la falta de sensibilidad en casos tempranos de enfermedad y la interpretación en caso de títulos aglutinantes bajos, pudiendo dar resultados negativos en primeras etapas de infección y en infecciones crónicas (Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012).

Al igual que RSAT, las reacciones con otros agentes infecciosos y los títulos ambiguos en animales infectados en forma crónica complican la PAT, por lo tanto, se utiliza la modificación con ME, ya que elimina algunos falsos positivos (Greene y Carmichael, 2012).

Posee valores de sensibilidad de 95.9% y especificidad de 96.7%. Utiliza Ag específico de *B. canis*, detectando únicamente presencia de IgG, ya que al principio de la infección solo se originan anticuerpos IgM, sensibles a la destrucción por el 2-ME, por lo que esta prueba puede ser negativa en esta etapa de la infección. A partir de la tercera a cuarta semana, se produce el aumento progresivo de IgG, aglutininas resistentes a la inactivación por el 2-ME, que son las que dan las reacciones de aglutinación en esta prueba (Ramírez López, 2005).

Los resultados de 2ME-RSAT se correlacionan adecuadamente con 2ME-PAT y ambas deberían considerarse como pruebas de control (Greene y Carmichael, 2012).

La falta de reactivos o métodos estandarizados hace que las comparaciones entre títulos de 2ME-PAT absolutos sean difíciles. De todas maneras, un título de 1:50 puede ser considerado negativo, indicar infecciones muy tempranas (menos de 3 semanas) o bien en recuperación. Títulos de 1:50 a 1:100 deben considerarse con sospecha de infección y deben ser repetidos 30 días después (Queiroz de Oliveira, 2008). Títulos 1:200 o superiores presuponen infección activa ya que frecuentemente se correlacionan con hemocultivos positivos. Sin embargo, se encontró que los sueros de perros no infectados presentan títulos de 1:50 a 1:100 y en ocasiones superiores (Queiroz de Oliveira, 2008; Greene y Carmichael, 2012).

### **2.7.3.3 Prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA)**

Esta prueba emplea antígenos seleccionados, como procedimiento sensible y específico para el serodiagnóstico de brucelosis canina y consiste en una reacción de precipitación entre antígeno y anticuerpo que difunden uno hacia el otro, a través de un gel de agar formando bandas visibles de precipitación. El Ag (antígeno) reacciona con el C+ (control positivo) y con sueros positivos formando una línea de precipitación, mientras que en el animal sano no forma ninguna línea de precipitación. Es de bajo costo y de fácil procesamiento e interpretación (Ramírez López, 2005). (Fig 3 y 4)



**Figura 3: Técnica de Inmunodifusion en gel de agar (IDGA)**



**Figura 4: El Ag (antígeno) reacciona con el C+ (control positivo) y con sueros positivos formando una línea de precipitina**

**Hay dos métodos de IDGA:**

IDGA-LPS que utiliza antígenos lipopolisacáridos presentes en pared celular de brucelas rugosas e IDGA-PC que utiliza como Ag extracto proteico de citoplasma bacteriano de *B. canis* (M-) (Queiroz de Oliveira, 2008) o antígenos citoplásmicos internos liberados por sonicación de *B. canis* o *B. abortus* (Greene y Carmichael, 2012).

Los antígenos citoplasmáticos son compartidos solo por especies de brucelas y no reaccionarán con anticuerpos de otros géneros de bacterias como se observa en las pruebas de aglutinación, pero presentan reacción cruzada con *B. suis*, *B. abortus* y *B. ovis*. Por otra

parte, los antígenos que contienen lipopolisacárido rugoso (IDGA-LPS) no dan reacciones cruzadas con especies de brucelas lisas, pero presentan los mismos problemas de reacciones cruzadas que las pruebas de aglutinación, aunque es posible distinguir sueros positivos de sueros falsos positivos por una banda de precipitina a *B. canis* (Ramírez López, 2005; Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008).

**a)-IDGA-LPS:** puede detectar anticuerpos entre 8 y 12 semanas PI. Infecciones crónicas pueden no ser detectadas, ya que a partir de los 4 meses después de finalizar la bacteriemia disminuyen los Ac circulantes. En algunos perros pueden ocurrir resultados falsos negativos, se presume que con infecciones en etapas tempranas. Los sueros de estos animales son positivos a RSAT y negativos a IDGA (Greene y Carmichael, 2012).

**b)-IDGA-PC:** Debe utilizarse como prueba confirmatoria después de otros métodos serológicos. Puede detectar específicamente precipitinas en sueros de perros después de que otras pruebas arrojaron resultados ambiguos o incluso negativos. Una desventaja es el mayor período entre infección y presencia de precipitinas detectables (Greene y Carmichael, 2012). Es muy útil en la detección de infección crónica, siendo capaz de detectar anticuerpos de 12 semanas a 36 meses después de finalizada la bacteriemia (Queiroz de Oliveira, 2008). Una o más líneas de precipitinas pueden persistir incluso 12 meses después de que cesó la bacteriemia (Greene y Carmichael, 2012).

Una alta proporción de los sueros enviados a laboratorios de referencia para realizar pruebas IDGA-PC que son positivos o sospechosos en la prueba comercial 2ME-RSAT o 2ME-PAT resultan ser reacciones falsas positivas (Greene y Carmichael, 2012).

#### **2.7.3.4 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas**

El kit comercial Brucella iELISA, es un kit de iELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el lipopolisacárido rugo (LPSr) de *B. canis* en muestra de suero. Es un ensayo de inmunoenzimas indirecto en fase sólida basado en la detección de anticuerpos del isotipo IgG dirigidos contra el lipopolisacárido de *B. canis*. Es una técnica altamente sensible y específica. Lucero (2002) reportó una especificidad de 96,7 a 100% y sensibilidad 100%. Debido a esto se recomienda su uso como prueba confirmatoria en casos de perros que hayan salido positivos en otras pruebas diagnósticas (Ramírez López, 2005).

Presenta como ventaja que emplea muy pequeña cantidad de suero y da muy buenos resultados aun en presencia de hemólisis (Castro *et al.*, 2005). Detecta IgG e IgA, útiles para evaluar el estado clínico del perro (Ramírez López, 2005).

Dada su conveniencia, los métodos de ELISA podrían ser evaluados, adicionalmente como pruebas de control y para cuantificar las respuestas serológicas en perros infectados en forma natural y experimental (Greene y Carmichael, 2012).

### **2.7.3.5 Aislamiento bacteriano**

El hemocultivo es el método de elección y el más recomendado para aislar *B.canis* y el procedimiento diagnóstico definitivo, para declarar al animal infectado. No debería ser el único criterio para identificar infección porque la bacteriemia puede no estar presente o ser intermitente en animales infectados de manera crónica (Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008), por lo tanto, un cultivo negativo no puede usarse como criterio para excluir una infección por *B. canis* mientras que el positivo confirma el diagnóstico (Lucero *et al.*, 2002; Ebani *et al.*, 2003; Miranda y Báez, 2005)

El hemocultivo permite diagnosticar infecciones tempranas, teniendo en cuenta que en las primeras 4 semanas PI, las pruebas serológicas y los cultivos de semen y orina son aún negativos (Del Águila Padilla, 2007). La administración de antibióticos puede interferir con el aislamiento del organismo (Greene y Carmichael, 2012)

La sangre es la mejor fuente para aislar el microorganismo, utilizándose anticoagulantes como heparina o citrato (Fig 6) y no con EDTA ya que inhibe el crecimiento de *B.canis*. Debe tomarse sangre entera para realizar el cultivo, porque los organismos están asociados con la fracción leucocítica (Greene y Carmichael, 2012). En caso de hemocultivo negativo, la bacteria puede ser recuperada en aspirados de medula ósea (Queiroz de Oliveira, 2008), ya que afecta al sistema reticuloendotelial (Ramírez López, 2005).



**Figura 5: Caldo de cultivo con citrato para aislamiento bacteriano**

En machos *B. canis* puede ser aislada en cultivo de semen, epidídimo y próstata. Recoger semen eyaculado resulta valioso para realizar cultivo durante los 3 primeros meses Pi, cuando la concentración de organismos es mayor. Los cultivos de epidídimo suelen ser negativos después de las 100 semanas y 64 semanas Pi se puede aislar de próstata. La eliminación intermitente puede dificultar el aislamiento (Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008, Ramirez Lopez, 2005).

En hembras, el útero grávido o estroal, placenta y líquidos vaginales o uterinos son los tejidos más consistentes para realizar el aislamiento (Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008). La única bacteria aislada de la vagina que debe ser considerada patógena estricta es *B.canis*.

Salvo por cistocentesis, aislar *B. canis* de orina puede ser dificultoso debido al crecimiento excesivo de contaminantes uretrales, no obstante, la orina recogida vía uretral puede contener mayores niveles de semen, que es una fuente predominante de organismos de *B.canis* (Greene y Carmichael, 2012). De 8 a 30 semanas PI, puede eliminar a través de orina de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/ml (Queiroz de Oliveira, 2008).

Mediante la necropsia, se puede aislar *B. canis* de varios tejidos de perros positivos en hemocultivo, como ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. Puede realizarse cultivo del disco intervertebral o hueso extraídos en cirugía, o de material recogido mediante aspiración con aguja en el espacio del disco. En caso de uveítis, se puede aislar del humor acuoso (Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008).

En fetos, poseen alta concentración del microorganismo tejidos tales como pulmón, bazo, hígado, nódulos linfáticos, sangre y principalmente estómago e intestinos, sugiriendo que la infección fetal puede ocurrir por la ingesta de fluido amniótico (Del Águila Padilla, 2007)

#### **2.7.3.6 Cultivo en Laboratorio**

Generalmente se observan colonias de bacterias con características rugosas y granulares. Según el pH del medio, varía el desarrollo de las cepas, si es un pH 7,2 crecerán con mayor facilidad cepas de tipo mucoide la cual se denomina (M+) pero, si el pH es de 6,5 el cultivo favorecerá el desarrollo de cepas no mucoides o (M-) (Greene y Carmichael, 2012)

Suelen agregarse antibióticos como bacitracina, polimixina a los medios antes del cultivo, para evitar la contaminación secundaria, ya que puede haber sobrecrecimiento de bacterias que crecen más rápidamente Se utilizan como medios de cultivo Albimi, Tripticasa

soja o caldo triptosa, en los cuales se coloca muestras de líquidos o sangre del animal durante 4 a 5 días a 37°C, y luego se agrega citrato como anticoagulante en ambiente aerobio. Después de 4 a 7 días de crecimiento, se esparcen los cultivos en un medio sólido, como agar *Brucella*, agar triptosa, agar sangre, (Figura 7) agar tripticasa soja o medios de Thayer-Martin (Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012).



**Figura 6: Cultivo en agar sangre y desarrollo de colonias de *Brucella canis***

Otra procedimiento es colocar las muestras mencionadas anteriormente, directamente en medios sólidos e incubarlas en forma aeróbica a 37°C (Greene y Carmichael, 2012).

El tiempo de espera para poder observar algún tipo de crecimiento es como mínimo 48hs. Al principio las colonias se ven pequeñas y translúcidas y se tornan mucoides después de 5 a 7 días de incubación (Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012).

La utilización del caldo debe reservarse para la obtención de grandes cantidades de cultivo, para el aislamiento primario a partir de muestras contaminadas por bacterias de crecimiento rápido y para cuando se prevea la presencia de un escaso número de brucelas (Ramírez López, 2005).

Producen catalasa, ureasa, oxidasa, no fermenta los azúcares y son inactivas desde el punto de vista metabólico. Las especies de *Brucella* son identificadas en base a: requerimientos de dióxido de carbono para su crecimiento, pruebas bioquímicas, crecimiento en presencia de tiónina y tinte fucsina básica y aglutinación en antisuero.

Sistemas de cultivo automatizado resultaron útiles para producir tiempos de aislamiento consistentes, entre 48 y 72 horas desde el momento de entrega de la muestra de sangre entera (Ramírez López, 2005).

### **2.7.3.7 Observación Microscópica**

Otro método utilizado es la observación de las brucelas por microscopía de improntas de material sospechoso. Aunque las brucelas no poseen una verdadera acidoresistencia tintorial, resisten la decoloración en una solución acuosa de ácido acético al 0.05% (Ramírez López, 2005).

La observación microscópica de pequeños bacilos o cocobacilos teñidos de rojo es un indicativo de la presencia de *Brucella spp.* La bacterioscopía es una técnica fácil, rápida y económica, pero siempre debe confirmarse mediante el cultivo del microorganismo. Las muestras a analizar, tanto para la bacterioscopía como para el cultivo posterior, deben ser de tejidos o secreciones presumiblemente infectadas, como secreciones vaginales post aborto, placenta, tejidos fetales, semen, bazo, nódulos linfáticos, hígado, útero o epidídimo (Ramírez López, 2005).

### **2.7.3.8 Detección genética**

Como método genético de análisis, se utiliza la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar especies de *Brucella* tanto en suero, leche, sangre como también en semen. Este es un método *in vitro* que presenta como ventajas ser rápido, sensible y específico, ya que sintetiza secuencias específicas de ADN bacteriano (Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012).

En efecto la sangre es ideal para detectar infección debido a la prolongada bacteriemia característica de *B. canis* (Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012). Algunos trabajos mencionan sensibilidad 100% y especificidad 98.5% debido a la interferencia de algunos elementos hemáticos considerados un factor limitante de su especificidad (Del Águila Padilla, 2007).

En humanos se identificaron, por lo menos, dos biovars de *B. canis*. La descripción molecular de los aislamientos resultó útil para diferenciar las distintas brucelas en el laboratorio clínico (Greene y Carmichael, 2012). Por lo tanto, la PCR resultó más sensible que los cultivos y la serología para detectar infección en pacientes humanos (Greene y Carmichael, 2012).

El hecho de que las secuencias de 16S ARNr conservadas de especies de *Brucella* de animales domésticos posean más del 98% de similitud indica que estos organismos están estrechamente relacionados con *Bartonella* y *Agrobacterium*. La región interespacial de este

gen es única para *Brucella* y resulta útil para diferenciar de otras bacterias aisladas (Greene y Carmichael, 2012).

## **2.8 Hallazgos Patológicos**

Los animales que sobreviven presentan linfadenomegalia y esplenomegalia. En bacteriemia crónica, los sinusoides de los ganglios linfáticos y el bazo están llenos de células plasmáticas y macrófagos que contienen bacterias fagocitadas (Greene y Carmichael, 2012). Microscópicamente se puede encontrar infiltrado mononuclear en cualquier órgano donde el microorganismo haya colonizado (Del Águila Padilla, 2007).

Algunos órganos como próstata, escroto, prepucio o vulva generalmente presentan vasculitis necrotizante (Del Águila Padilla, 2007). En órganos genitourinarios ocurre infiltración linfocítica submucosa difusa, lo que provoca la necrosis del parénquima prostático y de los túbulos seminíferos (Greene y Carmichael, 2012). Se describe presencia de glóbulos rojos en lumen y hemosiderófagos en túbulos seminíferos sugiriendo alteración de la barrera hematotesticular (Ramírez López, 2005; Ardoino, 2006).

En perros azoospermicos, la espermatogénesis solo avanza hasta espermatocono primario, sin presencia de espermátidas ni espermatozoides. Baja concentración y motilidad de espermatozoides, retención de gota citoplasmática, colas enrolladas y aglutinaciones, son algunas de las anormalidades que se pueden presentar en el semen de los animales afectados (Ardoino, 2006; Queiroz de Oliveira, 2008; Ardoino, 2006; Greene y Carmichael, 2012).

En útero se observa la presencia de hiperplasia glandular y nódulos de células reticulares, tanto en endometritis aguda como crónica (Greene y Carmichael, 2012). Fetos abortados están autolizados parcialmente, presentan edema subcutáneo, congestión y hemorragia de región subcutánea abdominal, efusiones peritoneales serosanguinolentas y lesiones degenerativas en hígado, bazo e intestinos (Banegas, 2003; Queiroz de Oliveira, 2008).

Iridociclitis granulomatosa y retinitis provocada por infiltración difusa de linfocitos, neutrófilos y plasmocitos pueden estar presentes, además de leucocitos en la cámara anterior (Greene y Carmichael, 2012).

Algunos perros presentan anormalidades renales como engrosamiento hialino en membrana basal glomerular. Se ha observado nefritis intersticial leve (Greene y Carmichael, 2012), necrosis hepática focal, miocarditis, bronconeumonía y meningoencefalitis (Banegas, 2003; Greene y Carmichael, 2012).

## 2.9 Tratamiento

Durante 2 a 4 semanas PI existe bacteriemia, si no se trata, persiste durante períodos largos (1 a 2 años o más). El número de bacterias en sangre excede  $10^3$  UFC/ml después de 4 a 5 semanas PI, y permanece alto durante muchos meses (Greene y Carmichael, 2012)

El resultado del tratamiento antibiótico es incierto, ya que además de ser un organismo intracelular, *B. canis* es sensible a varios antibióticos *in vitro*, pero la ineficacia del tratamiento *in vivo* conduce a fallas o recaídas (Hollet, 2006; Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012; Queiroz de Oliveira, 2008).

Nunca tratar con un único antibiótico, debe utilizarse combinación de estos y uno debe tener un grado de penetración celular adecuado. Ningún protocolo terapéutico es 100% exitoso (Hollet, 2006; Del Águila Padilla, 2007; Greene y Carmichael, 2012; Cote, 2010).

Los tratamientos ensayados y que fueron exitosos incluyeron el uso de vancomicina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftriaxona, combinaciones de doxiciclina con estreptomina o rifampicina (Ying *et al*, 1999; Soloaga *et al*, 2004), cotrimoxazole y estreptomina (Schoenemann *et al*, 1986).

El tratamiento más satisfactorio ha sido una combinación de una tetraciclina con dihidroestreptomina (Shin y Carmichael, 1999; Ramírez López, 2005; Hollet, 2006; Tilley y Smith, 2008).

Tratamiento con doxiciclina o minociclina oral en dosis altas, combinado con estreptomina intramuscular experimentalmente arrojó la mayor proporción de éxito. Gentamicina en reemplazo de dihidroestreptomina resultó con menor eficacia (Ramírez López, 2005; Greene y Carmichael, 2012).

Mediante la concentración inhibitoria media, se demostró la sensibilidad *in vitro* a tetraciclina, cloranfenicol, aminoglucósidos, sulfonamidas, espectinomicina, rifampicina, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolonas. Se observó sensibilidad parcial *in vitro* con eritromicina, penicilina, novobicina y lincomicina (Greene y Carmichael, 2012), encontrándose resistencia a macrólidos (Ardoino, 2006).

Se observó sinergia *in vitro* entre tetraciclinas y fluoroquinolonas y entre aminoglucósidos y sulfonamidas (Ardoino 2006; Greene y Carmichael, 2012).

Se mostró que ciprofloxacina, norfloxacina y enrofloxacin son eficaces *in vitro* contra especies de *Brucella*, pero estudios limitados *in vivo* mostraron que no lo son (Greene y Carmichael, 2012). Las tetraciclinas provocan una disminución del título de anticuerpos que puede regresar después de discontinuar el tratamiento, ya que las tetraciclinas no son bactericidas.

El tratamiento médico debe ir acompañado del tratamiento quirúrgico (ovariectomía y orquiectomía) (Greene y Carmichael, 2012), así como infecciones oculares graves pueden requerir enucleación del ojo afectado (Greene y Carmichael, 2012).

La bacteria debe ser completamente eliminada del cuerpo para que un tratamiento sea considerado efectivo y exitoso, siendo esto una dificultad reconocida en el caso de todas las infecciones por *Brucella spp* (Ramírez López, 2005). Los informes de recuperaciones exitosas deben tomarse con precaución, a menos que los cultivos y las serologías posteriores se hayan realizado durante por lo menos 6 meses (Greene y Carmichael, 2012). Si el animal vuelve al estado seronegativo y hay ausencia de bacteriemia al menos por tres meses, el tratamiento fue efectivo (Ramírez López, 2005; Tilley y Smith, 2008).

Frecuentemente la bacteriemia vuelve días a meses después de discontinuar el tratamiento, siendo el examen de seguimiento esencial, porque los animales pueden alojar todavía la infección en ciertos tejidos (Greene y Carmichael, 2012). Se recomienda monitorear durante y después del tratamiento a los animales tratados (Ardoino, 2006).

Se logran mejores resultados en hembras infectadas, debido posiblemente a la dificultad de eliminar los focos de infección del tracto genital del macho, en especial de la próstata (Ramírez López, 2005; Del Águila Padilla, 2007).

Debe considerarse entre propietario y veterinario, la posibilidad de eutanasia frente al fracaso del tratamiento posterior a la castración (Queiroz de Oliveira, 2008; Tilley y Smith, 2008; Cote, 2010).

### **2.9.1 Animales reproductores**

No se recomienda el tratamiento, sino aislar perros sospechosos y eliminarlos de programas de reproducción cuando se confirme el diagnóstico y evaluar todo el resto de perros del plantel (Ramírez López, 2005; Greene y Carmichael, 2012; Tilley y Smith, 2008; Cote, 2010).

Pese al tratamiento, machos enteros con frecuencia desarrollan esterilidad irreversible. Además, estudios sugieren incapacidad para eliminar infección de próstata en mayoría de los casos (Shin y Carmichael, 1999; Greene y Carmichael, 2012).

Las pruebas diagnósticas y la eliminación de los perros infectados son los únicos métodos probados de erradicación de la *B. canis* en un criadero infectado (Shin y Carmichael, 1999).

### **2.9.2 Animales de compañía**

El tratamiento consiste en la esterilización quirúrgica y antibioticoterapia para disminuir la probabilidad de infectar a los propietarios a través de secreciones (Greene y Carmichael, 2012; Tilley y Smith, 2008).

Títulos cuantitativos de ME-PAT es la mejor manera de evaluar la eliminación exitosa del microorganismo. Se deben evaluar a intervalos de 6 a 9 meses después del régimen de tratamiento. Los valores de los títulos deben disminuir si la terapia es eficaz (Greene y Carmichael, 2012). Deben alcanzarse títulos inferiores a 1:100 o se indicarán cursos de tratamiento adicionales. Persistencia de títulos aumentados (más de 1:100) debe suscitar sospecha que la infección aún está presente. Los resultados correspondientes de IDAG también deben ser negativos (Greene y Carmichael, 2012).

La decisión de tratar o sacrificar al animal dependerá del tipo de lesiones que tenga, cuidados de propietarios para disminuir riesgos de contaminación, seguimiento que se le pueda llevar y la cronicidad de la enfermedad (Ramírez López, 2005).

### **2.9.3 Infección ocular**

Excesivamente difícil tratar infecciones uveales con *B. canis*. Es difícil penetrar en los tejidos oculares, en especial con aminoglucósidos. Pueden necesitarse tratamientos tópicos o subconjuntivales con glucocorticoides, para controlar la inflamación intraocular y para prevenir la panoftalmítis irreversible se pueden realizar con flurbiprofeno o ciclosporina y gentamicina (Greene y Carmichael, 2012).

En ocasiones se requiere enucleación del globo ocular en caso de daño grave, porque la visión nunca retornará y el ojo actúa como nido persistente para el organismo (Greene y Carmichael, 2012).

### **2.9.4 Meningoencefalitis**

El tratamiento con antimicrobianos debe ubicarse en niveles máximos para obtener concentraciones razonables en el sitio de infección. A medida que la barrera hematoencefálica cura, es más difícil lograr las concentraciones para la eliminación de las infecciones del SNC (Greene y Carmichael, 2012).

### **2.9.5 Disco espondilitis**

Luego de realizada la castración se recomienda administrar dos o más cursos de 4 semanas como mínimo secuenciales o intermitentes de tratamiento antimicrobiano.

El uso de doxiciclina y aminoglucósidos para este tratamiento, es adecuado. En pocas ocasiones se necesita intervención quirúrgica, a menos que el trabajo diagnóstico requiera obtención de tejidos intervertebrales para realizar cultivo. (Greene y Carmichael, 2012). Se utilizan los títulos de anticuerpos a intervalos de 3 a 6 meses y radiografía secuencial para controlar el progreso (Greene y Carmichael, 2012).

### **2.10 Prevención**

Una de las principales medidas de prevención es no aceptar en criaderos, el ingreso de animales que tuvieron problemas de reproducción, a menos que los resultados de las pruebas sean negativos. Se deben realizar pruebas anuales y 3 o 4 semanas antes de cada apareamiento para que haya tiempo suficiente para informar los resultados de estos estudios. Si los perros salen del criadero realizar pruebas antes de volver a admitirlos (Shin y Carmichael, 1999; Ardoino, 2006; Greene y Carmichael, 2012; Cote, 2010).

También es necesario realizar cuarentena de un mes a todo animal nuevo hasta que resultados de dos pruebas serológicas en intervalos de 1 mes sean negativos (Hollet, 2006; Tilley y Smith, 2008).

Mantener la vigilancia mediante pruebas serológicas a los animales que ingresan a áreas libres con regulaciones de importación (Greene y Carmichael, 2012).

Deben controlarse todos los donantes sanguíneos en busca de brucelosis (Greene y Carmichael, 2012).

No se dispone de vacunas, y resultados de estudios experimentales han sido insatisfactorios. Se requeriría una vacuna que proporcione inmunidad duradera y que no interfiriera con el diagnóstico serológico (Shin y Carmichael, 1999; Greene y Carmichael, 2012).

### **2.11 Consideraciones de Salud Pública**

Las características biológicas del género *Brucella* como habilidad para persistir largos periodos de tiempo en medio ambiente, en condiciones propicias de humedad y temperatura, dosis infectante baja, y la forma de penetración en el organismo a través de las mucosas oral, nasal, conjuntivas, o piel explican su fácil transmisibilidad al humano (Lucero, 2012).

En contraposición a lo dicho anteriormente, otros autores afirman que los seres humanos son relativamente resistentes a *B.canis* y la enfermedad es relativamente leve comparada con infecciones por otras Brucelas. La tasa general de infección en relación con la exposición es baja (Greene y Carmichael, 2012).

La importancia de esta enfermedad podría estar subestimada teniendo en cuenta que la sintomatología es variable y la clínica es confusa (Lucero, 2012).

La enfermedad en el hombre solo es posible si existe una fuente animal con infección, o portación del microorganismo, por ello, la erradicación de la brucelosis humana presupone un adecuado control de la infección en los animales. (Lavaroni *et al*, 2011).

El contacto con perras que abortaron fue la fuente principal de infección para la mayoría de los dueños de mascotas infectadas, mientras que perros machos y fuentes no determinadas se reportaron en otros casos (Greene y Carmichael, 2012).

Los veterinarios también pueden infectarse mediante inoculación accidental o absorción ocular de las vacunas vivas atenuadas de *B. abortus* o *B. melitensis*. (Greene y Carmichael, 2012; Lavaroni *et al.*, 2011)

La brucelosis es la infección contraída en laboratorio informada con mayor frecuencia, es decir es considerada como una enfermedad ocupacional. La manipulación de cepas de *Brucella* debe realizarse teniendo en cuenta que se trata de un microorganismo clasificado en el nivel de riesgo III y pertenece al grupo B de gérmenes que pueden ser usados como potenciales armas biológicas (BEP, 2010)

Existen algunos motivos para que la enfermedad pueda estar subdiagnosticada y por ende subnotificada en laboratorios hospitalarios. Los aislamientos suelen presentar dificultades, los ensayos de identificación dificultosos y las pruebas serológicas limitadas a brucelas fase lisa (Lucero, 2012)

Además, se desconoce la cantidad real de casos debido a que con frecuencia las infecciones humanas se diagnostican mal (Greene y Carmichael, 2012).

## **CAPITULO 3: HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 HIPOTESIS**

En el Departamento de Santa Lucia, provincia de San Juan, los propietarios de mascotas que llevan sus canes al quirófano municipal de castración, cuentan con limitados recursos económicos y por ende, escasos controles veterinarios. A pesar de tener dueños, muchos caninos tienen hábitos de vagabundeo peri-domiciliario y contacto frecuente con animales sin sanidad. Estas situaciones de descontrol sanitario, sumado al desconocimiento de los propietarios sobre zoonosis que impactan en la Salud Pública, podrían favorecer la presencia y transmisión de Brucelosis canina y su potencial zoonótico.

### **3.2 OBJETIVOS**

#### **3.2.1 Objetivos Generales**

- Describir los antecedentes de presentación y características clínicas y sub-clínicas compatibles con brucelosis en pacientes caninos atendidos en clínicas privadas de San Juan
- Determinar la frecuencia de presentación de *Brucella canis*, en una población canina que asiste al quirófano municipal del departamento Santa Lucia de la Provincia de San Juan, en el periodo comprendido entre los meses de Noviembre y Diciembre del año 2017.

#### **3.2.2 Objetivos Específicos**

- Describir la frecuencia de exposición a variables fisiológicas relacionadas a la presentación de la enfermedad.
- Realizar a los animales positivos serológicamente, el aislamiento bacteriológico a través del hemocultivo para identificar la presencia de *Brucella canis* y confirmar el diagnóstico.
- Describir la frecuencia de presentación de signos clínicos y subclínicos en animales serológicamente positivos a brucelosis canina.

## **CAPITULO 4: MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Tipo de estudio**

Se realizó un estudio descriptivo, observacional. Con un muestreo no probabilístico.

### **4.2 Área de estudio**

El estudio se realizó en el Departamento de Santa Lucia de la Provincia de San Juan, entre los meses de julio del 2017 a julio del año 2018. Se contó con la participación conjunta de los Medicos Veterinarios a cargo del único quirófano municipal de castración y el personal a cargo del municipio. Además, se trabajó con siete clínicas privadas y el Laboratorio Veterinario de la Provincia de San Juan.

### **4.3 Poblaciones bajo estudio**

#### **Población 1**

Se evaluaron 27 caninos derivados de 7 clínicas privadas de San Juan, con síntomas compatibles de la enfermedad (casos sospechosos o probables), como también aquellos animales que viven con ellos. A estos animales se les realizo un examen clínico completo, cuyos datos se volcaron en una ficha clínica general, identificada numéricamente y además se les realizo hemograma completo.

#### **Población 2**

Según el Ministerio de Salud de la Nación (2007), en la Argentina, existe un perro cada cuatro habitantes y debido a que, tanto la Municipalidad de Santa Lucia, como Salud Pública de la Provincia de San Juan no cuentan con un censo que precise la población canina, se utilizó esta estimación.

La cantidad de habitantes en el Departamento de Santa Lucia es 62.000, por lo tanto, se calculan 15.500 animales, en dicho Departamento. Se muestrearon 100 animales en el periodo de noviembre y diciembre del año 2017.

El muestreo se hizo al azar, de los perros que asistían al quirófano municipal para ser sometidos a la técnica quirúrgica de ovario-histerectomía y orquiectomía, provenientes de viviendas particulares y callejeros llevados por la “Fundación Patitas sin Hogar”. Se les realizo la misma ficha clínica general, la cual también está identificada numéricamente, con

los datos de filiación del paciente, anamnesis y se determinaron las variables fisiológicas, para clasificarlos (ANEXO)

#### **4.4 Encuesta Epidemiológica:**

Previo al procedimiento de extracción de la muestra, a los propietarios de cada canino muestreado, se les realizó una encuesta organizada con preguntas cerradas. La terminología usada en la misma es sencilla, breve, precisa, objetiva y con lenguaje cotidiano para facilitar la rapidez de la respuesta. A través de esta encuesta se evaluaron aspectos importantes relacionados con la enfermedad (diferentes variables demográficas, ambientales, alimentarias y sanitarias), las cuales son consideradas de importancia en la aparición y permanencia de la Brucelosis, y que nos permitirán determinar el conocimiento sobre la patología por parte del propietario de la mascota, la existencia o no de sospecha del Médico Veterinario tratante y, antecedentes reproductivos relacionados.

#### **4.5 Muestras de suero:**

Se realizó extracción de sangre, por venopunción de vena yugular o cefálica, dependiendo del tamaño del animal tanto de animales con síntomas clínicos, como caninos asintomáticos en el momento de su esterilización y en el laboratorio. Luego se colocó en tubos de hemólisis. Se centrifugó a 1500 r.p.m por 15 minutos para separar suero de elementos formes, se colocó el suero obtenido de cada muestra en un tubo ependorf identificado de forma indeleble y se conservó en freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta la realización de las técnicas serológicas (Fig 8). También se extrajo sangre que se introdujo en forma estéril en tubos que contenían citrato de sodio como anticoagulante, para la realización de los Hemocultivos.

#### **4.6 Técnicas serológicas:**

Se realizaron las pruebas de antígeno tamponado en placa (BPA), aglutinación rápida en porta objeto (RSAT) con y sin agregado de 2-ME, inmunodifusión en gel de agar (IDGA), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA Indirecto) y Hemocultivo del microorganismo.

El diagnóstico serológico de *Brucella Canis*, se realizó en el laboratorio del Departamento de Patología Animal, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, como así también en el laboratorio de Brucelosis del SENASA Martínez de Bs As.

- **RSAT:** Sobre un portaobjeto se mezclaron 10  $\mu$ l de suero con 10  $\mu$ l de antígeno, luego se realizaron movimientos de rotación durante 2 minutos y se procedió a la lectura en un microscopio óptico a 10X.

- **2ME-RSAT:** Para realizar la prueba de aglutinación rápida en placa, con la cepa M (-), adicionando 2- $\beta$ -Mercaptoetanol, se mezcló 25  $\mu$ l del suero, 25  $\mu$ l de 2- $\beta$ -Mercaptoetanol, 0,2 M, y luego de un minuto se agregaron 50  $\mu$ l de antígeno RSAT; luego se esperan hasta dos minutos observando las muestras en un microscopio y, se determinan como positivas aquellas que presentan aglutinación fina, similar al control positivo (Giraldo *et al.*, 2009; Reisz, 2006).

- **BPA:** El ensayo fue realizado siguiendo el método descrito en el Manual de estándares para pruebas diagnósticas y vacunas (OIE, 2009). Se mezcló 80 ul de suero y 30 ul de Ag en un aglutinoscopio (Fig 9) Se esperan 4 min y se procede a mezclar y realizar la primera lectura, luego se esperan 4 min más y se procede a la segunda lectura.



**Fig 7: Antígeno de BPA y Aglutinoscopio**

- **IDGA:** El extracto salino en caliente (HS) de *B. ovis* Reo 198 fue elaborado como ha sido descrito por Myers et al (1972).

El agar es fraccionado en placas de Petri a razón de 15 ml y luego de solidificado se perforó con un sacabocado (fig 10) en forma de roseta con orificios de 3 mm de diámetro y una distancia de 3 mm entre ellos dispuestos en forma hexagonal. Los sueros problema y el suero control positivo fueron colocados en los orificios periféricos y el antígeno en el orificio central a razón de 25  $\mu$ l aproximadamente. Las placas fueron llevadas a una cámara húmeda y se procedió a la lectura entre las 48 y 72 horas.



**Fig 8: Agar fraccionado en placas de Petri, solidificado y perforado con un sacabocado en forma de roseta**

#### **4.7 Estudios Bacteriológicos. Hemocultivo**

Se analizaron 14 muestras de sangre de los caninos serológicamente positivos.

Las muestras fueron sembradas en caldo tripticasa soya - citrato y cultivadas en estufa a 37° C en aerobiosis durante 48 hs. Posteriormente fueron repicadas en agar sangre de carnero al 5% en idénticas condiciones de temperatura durante 48 hs mas.

#### **4.8 Análisis estadístico:**

Se describió la frecuencia de exposición a diferentes variables fisiológicas relacionadas a la presentación de la enfermedad.

Se describió la frecuencia de presentación de signos clínicos y subclínicos en animales serológicamente positivos a brucelosis canina.

Los datos obtenidos se procesaran en un Software Infostat (Di Rienzo y col. 2016)

#### **4.9 Evaluación y seguimiento clínico**

Posteriormente, a los animales muestreados, que resultaron positivos a las técnicas anteriormente mencionadas, se les realizo el hemocultivo y se les hizo un seguimiento clínico y subclínico, examinando con detalle fundamentalmente, los sistemas o aparatos más afectados por esta enfermedad: **Reproductor, Locomotor, Visual.**

Los datos y signos clínicos se recabaron en una ficha clínica particular (solo de estudios o síntomas clínicos de esos tres sistemas. ANEXO

## **CAPITULO 5: RESULTADOS**

Se analizaron 100 muestras de suero provenientes de caninos que asistían al quirófano municipal del Dpto. Santa Lucia de la Provincia de San Juan y 27 provenientes de las clínicas privadas. Las muestras fueron obtenidas en los meses de noviembre y diciembre de 2017.

### **5.1 Variables fisiológicas**

En primer lugar, se describe la frecuencia de exposición de las variables fisiológicas vinculadas a la presentación de la enfermedad (Tabla 2)

Con respecto al sexo, 37 perros (29 %) correspondieron a machos y 90 (71 %) a hembras (Grafico 1)

El promedio de edad fue 4.5 años (rango de 6 meses a 14 años), siendo el grupo etario más grande entre 0 y 4 años (Grafico 2)

El 34 % fueron de raza pura, siendo la raza indefinida (mestizo) la más frecuente en ambos sexos (66%) (Grafico 3)

De muchos animales se desconoce si tenían o no propietario ya que eran llevados por personal de la fundación Patitas sin Hogar, y muchos de ellos eran perros callejeros (Grafico 4).

De los animales con dueño (ya sean los de Santa Lucia o los provenientes de las clínicas) mas de la mitad, salían a la calle y por lo tanto tenían contacto con perros callejeros, es decir tienen hábitos de vagabundeo y son muy pocos los que no tienen acceso a la calle (Grafico 5)

Al momento de la toma de la muestra de sangre para la realización de las pruebas serológicas 116 animales (91%) estaban clínicamente sanos, mientras que 8 animales (7 %) presentaban algún tipo de síntoma clínico, y a los otros tres animales no se les realizo el examen clínico. (Grafico 6)

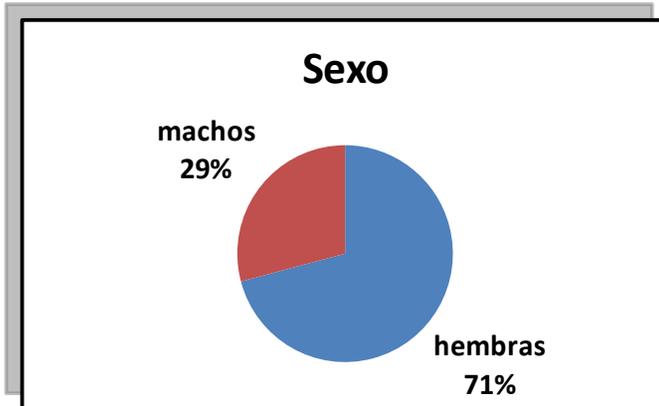
Los signos clínicos que presentaban los 8 animales se distribuían de la siguiente manera. Oculares (20%), Locomotores (30%), Reproductivos (40%) e Inespecificos (10%), considerando el 7 % como el 100 % (Grafico 7)

La totalidad de los animales que asistían al quirófano municipal, eran enteros y fueron castrados en el momento de la toma de muestra. Los provenientes de las clínicas privadas, 7 eran castrados, 9 enteros y de 11 animales se desconoce esta situación (Grafico 8)

**Tabla N° 2: Variables fisiológicas vinculadas a la presentación de la enfermedad**

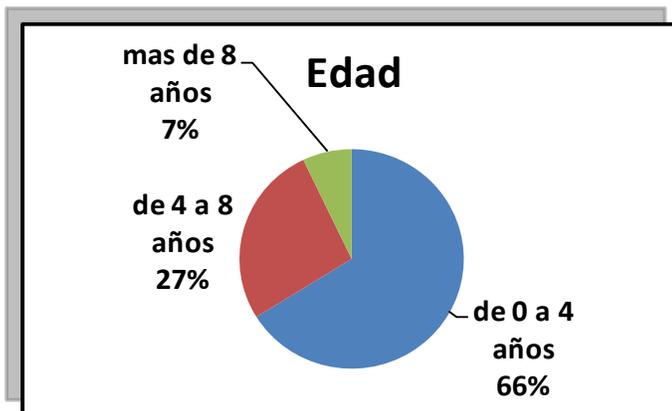
<b>Variable fisiológica</b>	<b>Categoría</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>	Macho	37	29
	Hembra	90	71
<b>Edad</b>	0-4 años	84	66
	4-8 años	34	27
	Mayor 8 años	9	7
<b>Raza</b>	Mestizo	84	66
	Pura	43	34
<b>Signos clínicos</b>	No presenta	116	91
	Inespecíficos (subclínicos)	1	10
	Locomotores	3	30
	Reproductivos	4	40
	Oculares	2	20
	No se sabe	3	2
<b>Salen a la calle</b>	Si	63	50
	No	31	24
	No se sabe	33	26
<b>Propietario</b>	Si	95	75
	No	6	5
	No se sabe	26	20
<b>Castrado</b>	Si	107	84
	No	9	7
	No se sabe	11	9

**Variables fisiológicas de los animales muestreados derivados de clínicas veterinarias y del quirófano municipal**



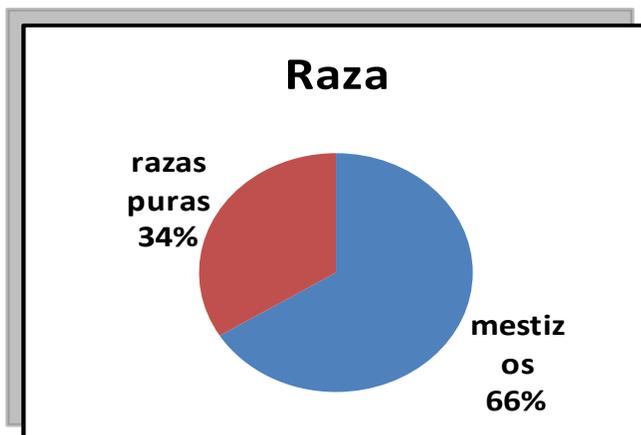
N= 127

**Grafico 1: Distribucion por sexo de los 127 animales muestreados**



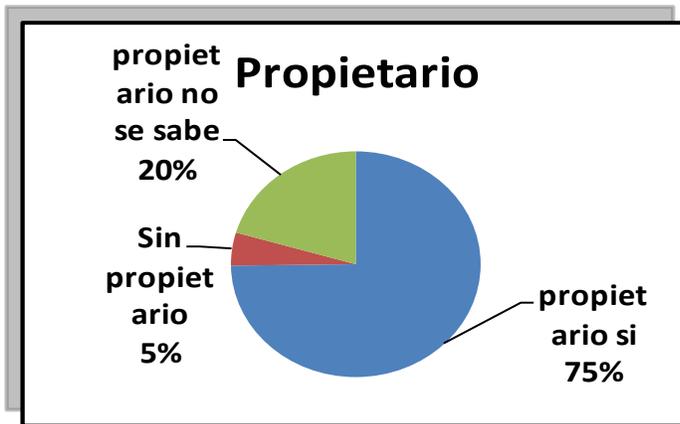
N= 127

**Grafico 2: Edad de los animales muestreados con y si síntomas de Brucelosis**

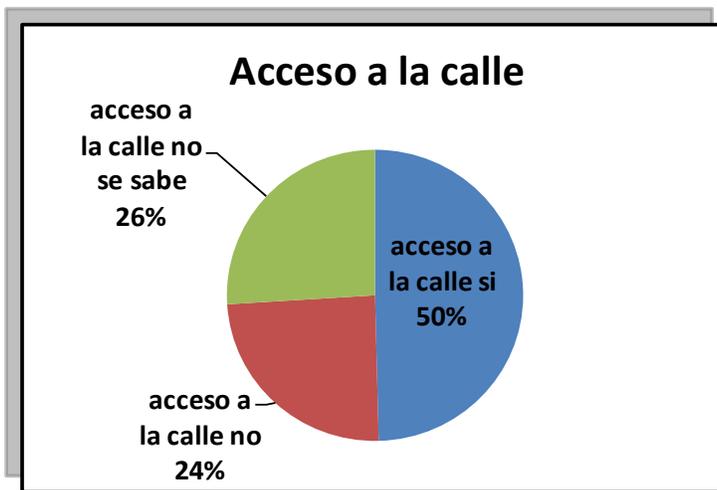


N= 127

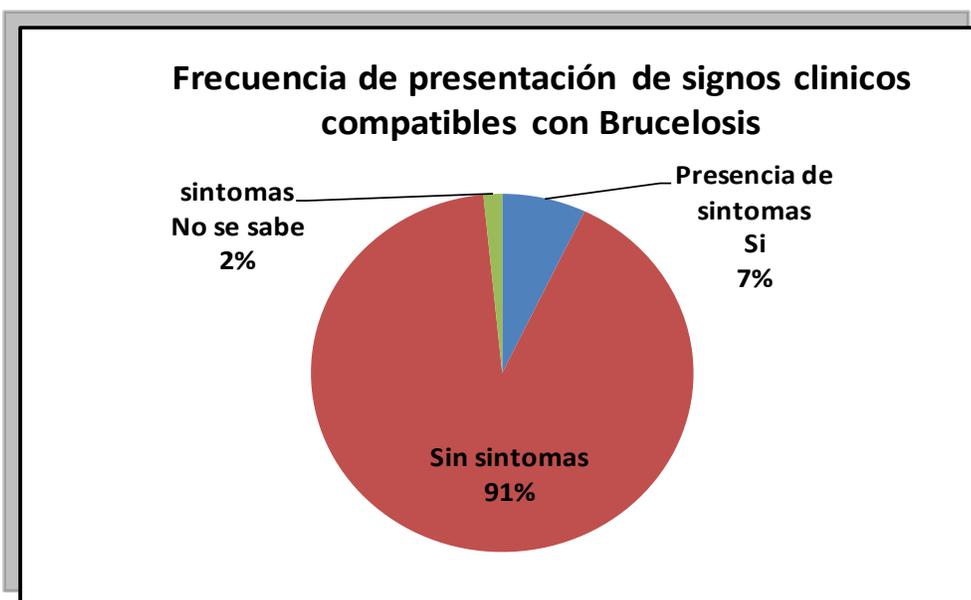
**Grafico 3: Distribucion por Raza de los 127 animales estudiados**



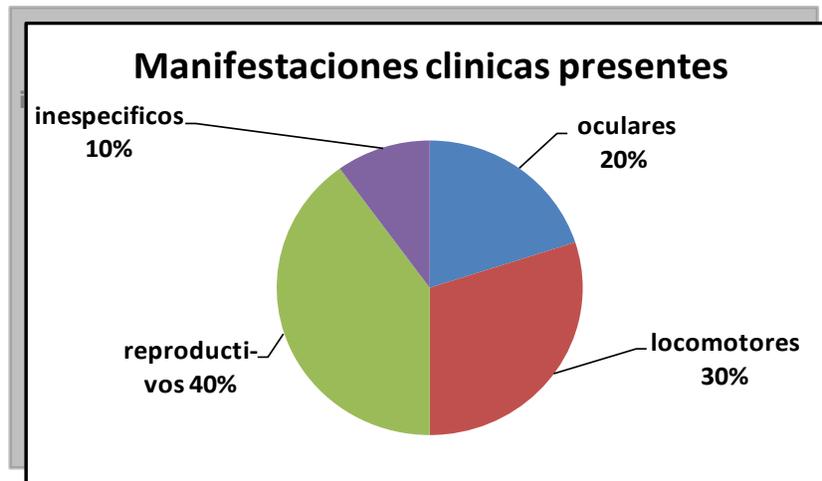
**Gráfico 4: Distribución de los canes según presencia o ausencia de propietarios responsables**



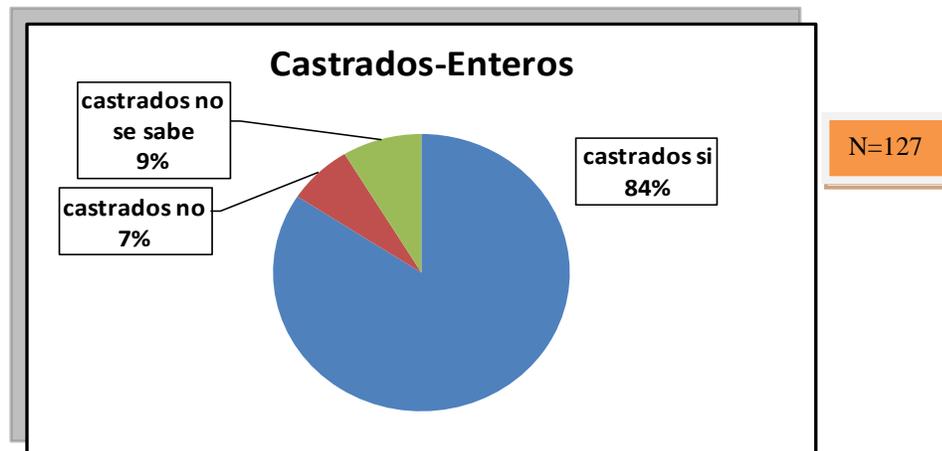
**Gráfico 5: Antecedentes de acceso a la calle de los animales bajo estudio**



**Gráfico 6: Presentación de síntomas compatibles con Brucelosis al momento del relevamiento serológico de los animales bajo estudio.**



**Grafico 7: Manifestaciones clínicas presentes en los 8 animales muestreados con síntomas compatibles con Brucelosis.**



**Grafico 8: Estado reproductivo de los animales muestreados**

## 5.2. Pruebas serológicas y bacteriológicas

En segundo lugar, se muestran los resultados en cuanto a niveles serológicos de positividad a *B. canis* obtenidos con diferentes técnicas diagnósticas (Tabla N° 3)

### Tablas de frecuencias

Variable	Clase	Categorías	FA
Columna2	2	confirmado	9
Columna2	5	sano	114
Columna2	6	sospechoso	4
Variable	Clase	Categorías	FA
RSAT	1	Dudoso	4
RSAT	2	Negativo	110
RSAT	3	Positivo	13
Variable	Clase	Categorías	FA
RSAT-2ME	2	Negativo	29
RSAT-2ME	3	No se hizo	89
RSAT-2ME	4	Positivo	9
Variable	Clase	Categorías	FA
BPA	1	Negativo	111
BPA	2	No se hizo	15
BPA	3	Positivo	1
Variable	Clase	Categorías	FA
IDGA	1	Negativo	101
IDGA	2	No se hizo	20
IDGA	3	Positivo	6
Variable	Clase	Categorías	FA
HEMOC	1	Negativo	14
Variable	Clase	Categorías	FA
SEGUNDO			
RSAT	1	Negativo	13
SEGUNDO			
RSAT	3	no se hizo	111
SEGUNDO			
RSAT	4	positivo	3

**Tabla N °3: Resultados de seropositividad a *Brucella Canis* obtenidos con diferentes técnicas diagnosticas.**

Sobre un total de 127 caninos muestreados, se establecen tres categorías de animales de acuerdo a diferentes criterios de interpretación: Confirmados, Sospechosos y Sanos (Grafico 9)

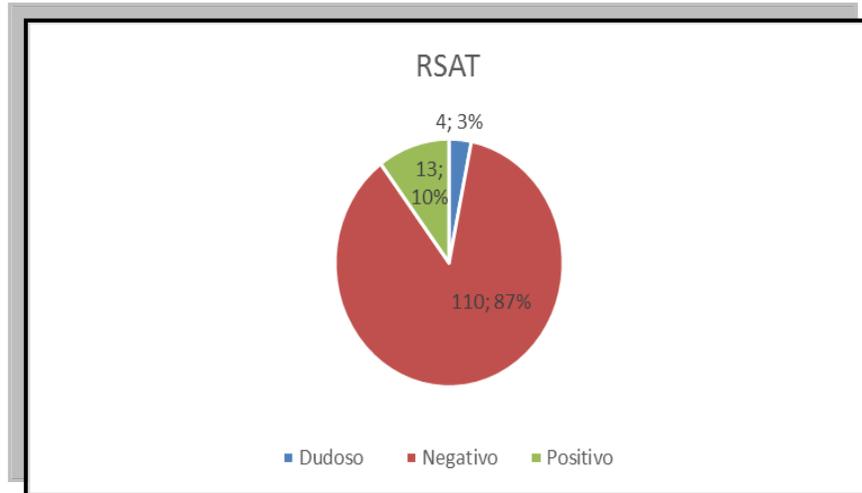
- **Confirmados:** Cuando RSAT dio positivo y 2 ME confirma que era IgG, donde no se realizo Elisa. Tambien son confirmados cuando fueron RSAT positivos y Elisa y 2 ME positivos.
- **Sospechosos:** Cuando dio positivos al RSAT, pero como no se pudo confirmar con Elisa, 2 ME ni tampoco se pudo aislar la brucela a partir del hemocultivo, quedan como casos sospechosos o probables.
- **Sanos:** Los animales que dieron negativos a todas las técnicas serológicas.



**Gráfico 9: Tres categorías de animales muestreados**

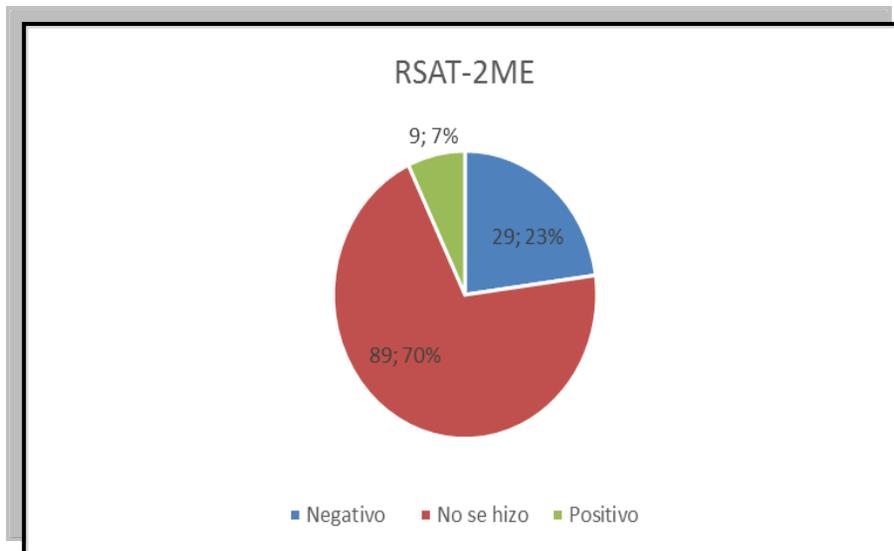
CONFIRMADO	9
SANO	114
SOSPECHOSO	4
	127

Los resultados serológicos de las muestras caninas procesadas mediante la técnica de RSAT se presentan en el gráfico N° 10, mostrando un 8.5 % (10/127) de animales seropositivos. Cabe aclarar que el 3,4% de los sueros resultó sospechoso frente al antígeno del RSAT, aunque ninguno pudo ser confirmado posteriormente por aislamiento en el hemocultivo.



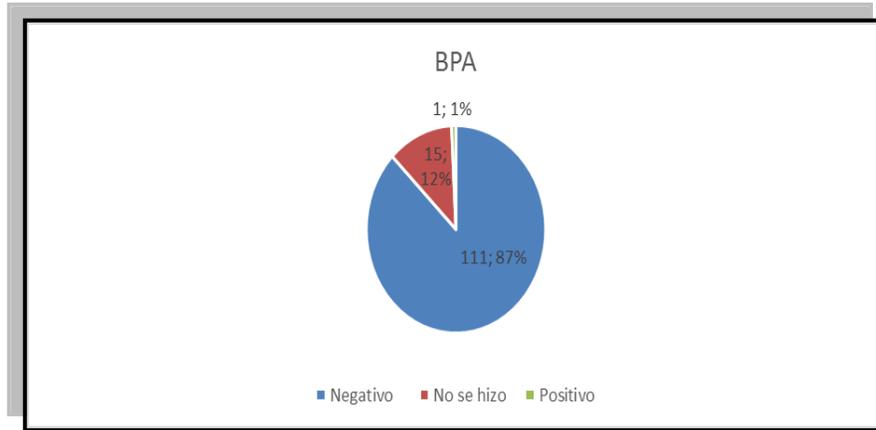
**Grafico 10: Resultados serológicos de los 127 caninos procesados con la técnica de RSAT**

Cuatro animales resultaron positivos al RSAT-ME. Dudoso 1, Negativos 9. No se hicieron 111 (Grafico 11).



**Grafico 11: Resultados del ME-RSAT**

En la población estudiada, solo 1 suero (1 %) resulto reaccionante a la prueba BPA. Negativos 109, dudoso ningún animal y no se hicieron 15 (Grafico 12)



**Grafico 12: Resultados serológicos procesados con la técnica de BPA**

Con respecto a la técnica IDGA, los resultados fueron los siguientes: De los 107 sueros procesados 6 resultaron positivos

Aislamiento bacteriológico: Del total de las muestras serológicamente positivos, en ninguna de las 14 muestras sembradas según la metodología del hemocultivo, se logró aislar brucelas.

Los resultados del segundo RSAT fueron los siguientes: 3 sueros positivos, 13 negativos, ningún dudoso y 111 no se hicieron

### **5.3 Aspectos clínicos y subclínicos**

Y por ultimo, se presentan tablas y graficos con los animales que tenían signos clínicos al momento de la toma de la muestra y el tipo de signo, como así también la frecuencia de presentación de los signos clínicos y subclínicos de los animales pertenecientes a las diferentes categorías anteriormente mencionadas.

**Tabla N° 4: Tabla que combina animales con signos clínicos al momento de la toma de muestra para serología, con el tipo de signos clínicos.**

	<b>Nina</b> <b>a</b> <b>(33)</b>	<b>Shorton</b>	<b>Milo</b>	<b>Snoopy</b>	<b>Apache</b>	<b>Zimba(SB)</b>	<b>Ayla</b>	<b>Carpo</b>
<b>Sin Signos</b>								

Aspectos clínicos y subclínicos de la Brucelosis Canina en San Juan  
Esp. Med.Vet. Maria Virginia Carrillo

Uveitis	X	X						
Dermatitis escrotal		X						
Neurologicos								
Falla en la concepcion							X	
Orquitis		X	X					
Abortos						X		
Discoespondilitis		X		X	X			
Inespecificos			X				X	X

**5.3.1 Aspectos clínicos y subclínicos de los animales serológicamente positivos**

**Tabla N° 5: Tabla que combina animales confirmados, con el tipo de signos clínicos.**

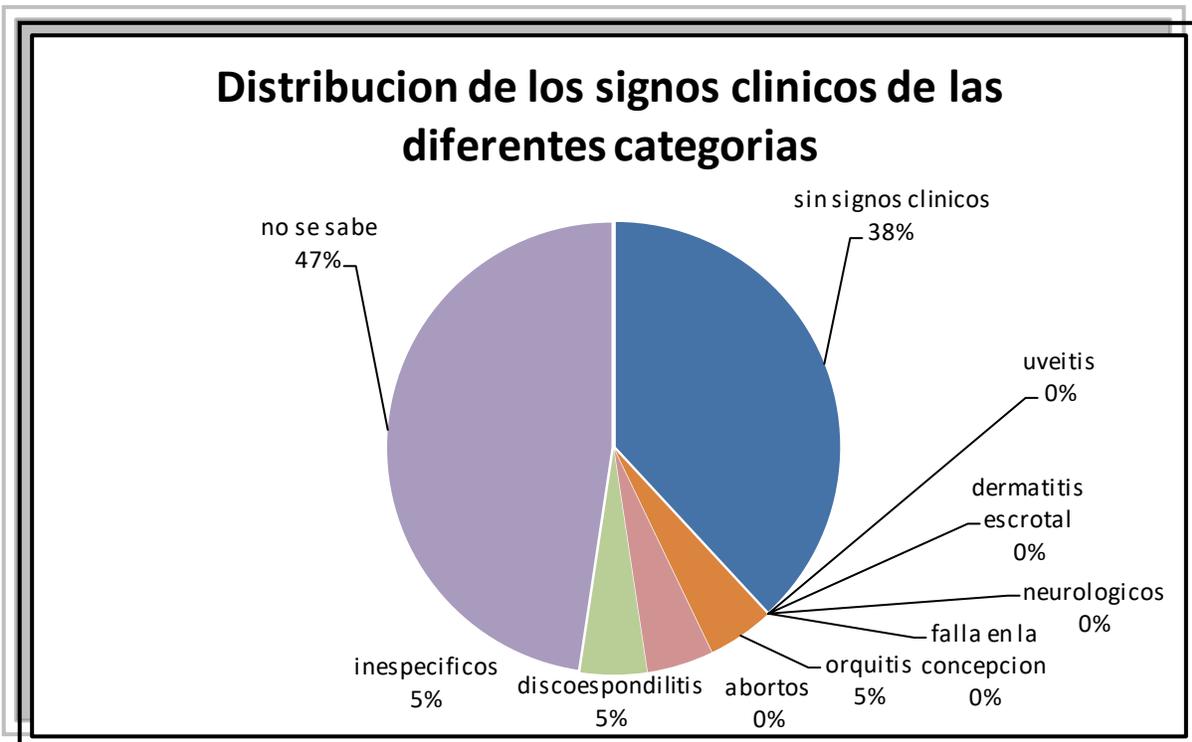
	Coca(2)	Kiara(52)	Simba(53)	Nina(87)	NN(99)	Uro	Milo	No se sabe 54	No se sabe 7
<b>Sin Signos</b>	Murio	X	X	X		X		x	x
Uveitis									
Dermatitis escrotal									
Neurologicos									
Falla en la concepcion									
Orquitis							X		
Abortos									
Discoespondilitis									
Inespecificos							X		
No se sabe					X				

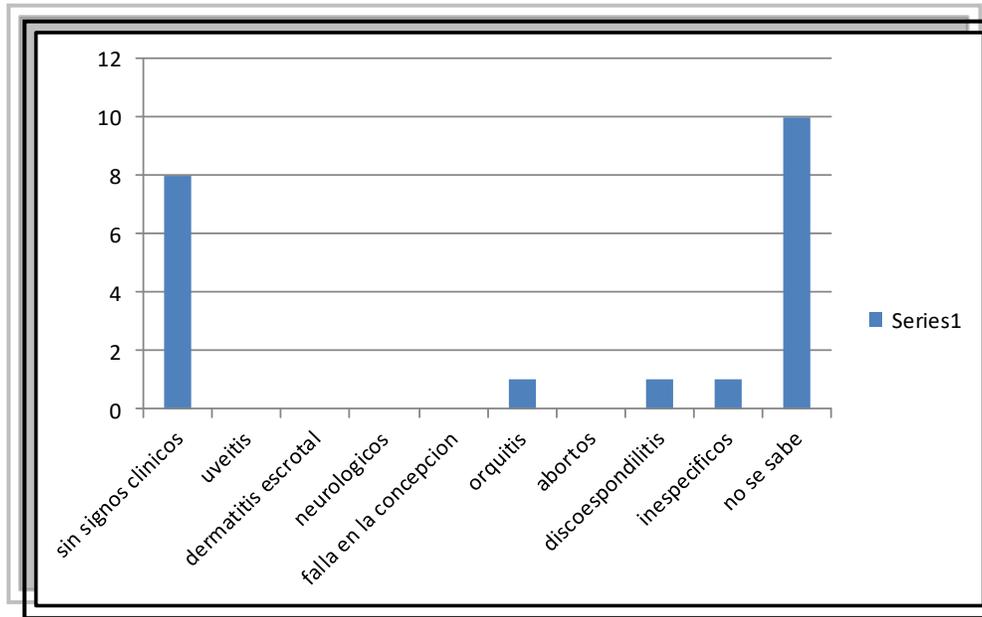
**Tabla N° 6: Tabla que combina animales sospechosos, con el tipo de signos clínicos.**

	Snoopy	Apache	Ayla	Carpo
Sin signos	X		X	
Uveitis				
Dermatitis escrotal				
Neurologicos				
Falla en la concepcion				
Orquitis				
Abortos				
Discoespondilitis		X		
Inespecificos				
No se sabe				X

En el examen clínico de los perros con serología positiva se observó, que la gran mayoría de ellos (38%) no manifestaban signos clínicos, solo tres tuvieron orquitis, discoespondilitis y signos inespecíficos (5%) (Grafico 13 y 14)

De 10 animales 47 (%), no se sabe si presentaron o no signos ya que no se pudieron encontrar debido a que son animales callejeros y también a que no se pudo ubicar al dueño.





**Grafico 13 y 14: Distribucion de signos clínicos de las diferentes categorías de animales con serología positiva y numero de animales**

### **5.3.2 Presentacion del caso clínico**

**Nombre: APACHE**

Reseña: canino macho de 4 años de edad, raza Dogo Argentino.

Se transcribe a continuación la historia clínica, los síntomas encontrados por el colega y los estudios complementarios solicitados.

**Abril 2014:** vacuna DA2P -CV y total full comprimidos.

**Mayo 2014:** DA2P – Leptospira.

**Junio 2014:** Parvovirus con Coronavirus.

Vive actualmente en un taller automotor, y tiene acceso continuo a la calle.

**29/05/2017:** Se presenta a la consulta por dolor agudo con sintomatología sugestiva de hernia de disco cervical. Temperatura 39,6 °C. A la exploración no se determina punto álgido. Se solicita orina y bioquímica general. Tratamiento desafiante con Triamcinolona 0,5 ml, hasta esoerar los resultados..

**12/06/2017:** dolor en miembro posterior izquierdo. Se sugiere Rx de cadera, lumbosacra y cervicales.

**14/06/2017:** ruptura de ligamento cruzado izquierdo, con articulación coxofemoral normal. Discoespondilitis grave en C6-C7, sospechosa de Brucelosis por lo que solicita RSAT el cual da positivo.

Instaura el tratamiento con doxiciclina 5 mg/kg/12Hs durante dos semanas, también indica la estreptomycin pero no se la dan porque no la consiguen.

Se realiza la castracion

El suero de Apache fue procesado en la Universidad Nacional de Rio Cuarto (U.N.R.C.) sospechoso de brucelosis; a su vez al manifestar un dolor difuso a nivel lumbar, se sospecha de una nefritis intersticial y se solicita también la MAT, resultando positivo para los serovares Canicola, Icterohaemorrhagiae y Pyrogenes.

Se le comunica al colega sobre el resultado positivo a esos serovares, y el colega indica antibioticoterapia.

Apache fue visitado en varias oportunidades, para seguir sus síntomas clínicos, y según su propietario no manifestó ninguna sintomatología compatible con Brucelosis.

**16/05/2018:** Se extrae sangre para Hemocultivo el cual resulta negativo, y este mismo suero el **03/07/2018:** se le realizó nuevamente RSAT en el Laboratorio de la UNRC, y volvió a dar positivo

El caso clínico queda como sospechoso ya que se necesitaría otro hemocultivo o Ielisa para confirmarlo.

## **CAPITULO 6: DESCRIPCION DE LA EXPERIENCIA DE LA TECNICA SEROLOGICA, iELISA REALIZADA EN SENASA MARTINEZ BUENOS AIRES.**

En este ensayo se utilizo el kit VETLIS Brucella iELISA Caninos, el cual es un Kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección de anticuerpos específicos contra el lipopolisacárido rugoso (LPS<sub>r</sub>) de Brucella canis en muestras de suero. Es un enzimoimmunoensayo indirecto en fase solida basado en la detección de anticuerpos del isotipo igG dirigidos contra el lipopolisarido de Brucella canis.

Este estudio se constituye en el segundo trabajo de este tipo efectuado a nivel nacional.

Lucero (2002) reportó una especificidad de 96,7 a 100% y sensibilidad 100%. Debido a esto se recomienda su uso como prueba confirmatoria en casos de perros que hayan salido positivos en otras pruebas diagnósticas. (Ramírez López, 2005).

Dada su conveniencia, los métodos de ELISA podrían ser evaluados, adicionalmente como pruebas de control y para cuantificar las respuestas serológicas en perros infectados en forma natural y experimental. (Greene y Carmichael, 2012).

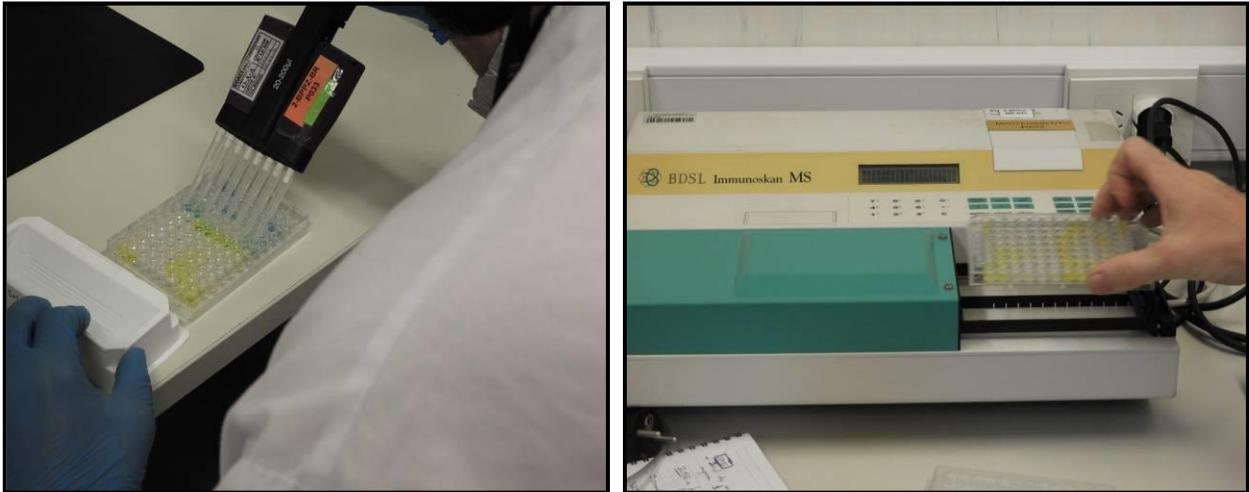
El kit consta de los siguientes componentes: Microplaca de analisis, solución de lavado, conjugado, solución de sustrato cromógeno, solución de frenado, diluyente de muestra, control positivo y control negativo (Fig 10)



**Figura 9: Componentes del kit iELISA para *Brucella canis***

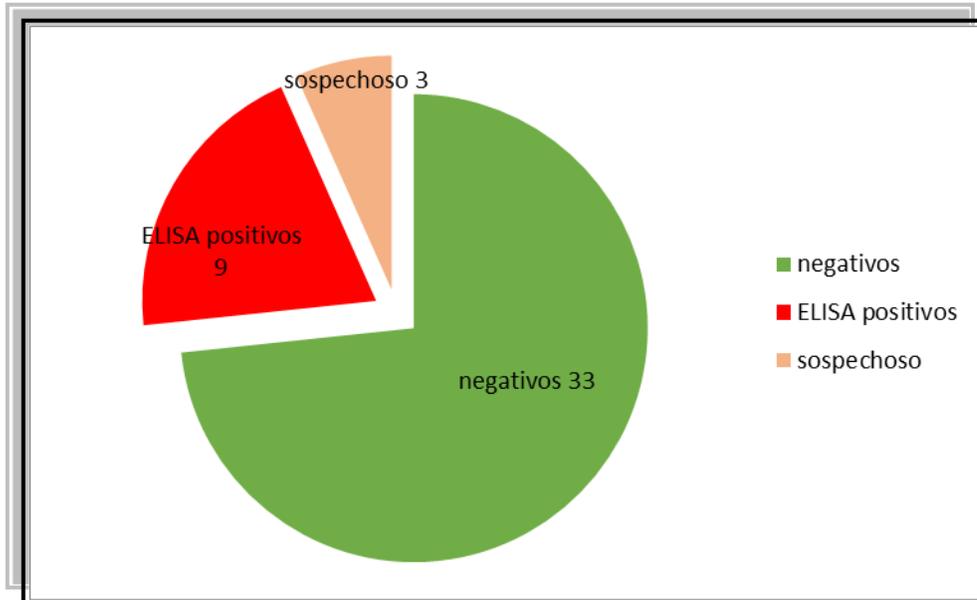
- **iELISA:** Las muestras de suero son de 45 perros, 10 que tenían signos compatibles con Brucelosis, y a aquellos que habían dado positivo y dudoso al RSAT. Y el resto se elije al azar hasta completar 45 animales, que son la cantidad de pocillos que traen la microplaca.

Se colocaron en los pocillos recubiertos con el antígeno (LPSr) de *Brucella canis*. Si la muestra contiene anticuerpos anti (LPSr), estos se unen al antígeno inmovilizado en el pocillo. Al añadir el conjugado de peroxidasa de rabano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos unidos al pocillo. Luego se lavo para eliminar el material libre y se agrego la solución del sustrato cromógeno, el color azul que aparece en el producto de la reacción del sustrato cromógeno con el conjugado representa a muestras positivas. La intensidad del color depende de la cantidad de anticuerpos. La reacción se detiene mediante el agregado de la solución de frenado y se observo un cambio de color al amarillo. La lectura de los resultados se realizo en un espectrofotómetro de microplacas midiendo la absorbancia (Abs) a 45 nm (Fig 11).



**Fig 10: Agregado de los constituyentes del kit y espectrofotómetro para la lectura de los resultados.**

Los resultados se expresaron como porcentaje de radiactividad (PR) con respecto al suero control positivo incluido en cada ensayo. PR mayor a 51 %: positivo; menor o igual a 32% negativo y PR menor o igual a 51% dudoso. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla 7) Negativo 33, Positivos 9, sospechosos 3 (Grafico 15)



**Grafico 15: Resultados serológicos de 45 caninos procesados mediante Ielisa**

**Tabla N° 7: Resultados del la técnica IELISA**

***Brucella canis* (Vetlis) Lote N° 15-VLO3/1711-1**

<b>Placa N° 2</b>	<b>VALIDACION</b>	Limites	
<b>FECHA 08/2/18</b>		inferior	superior
<b>OPERADOR S. E</b>	Densidad óptica C++		válido
	Densidad control negativo		válido
	Densidad blanco de muestra		válido
	Control positivo / Control Negativo		válido

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	C++											
<b>B</b>	C++											
<b>C</b>	C-											
<b>D</b>	C-											
<b>E</b>												
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>												

**DO**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,416	0,005	0,077	0,019	0,003	0,089	0,011	1,441	0,255	0,043	0,005	1,998
<b>B</b>	1,41	0,004	0,091	0,021	0,006	0,089	0,012	1,474	0,261	0,042	0,007	2,028
<b>C</b>	0,015	0,011	0,004	0,079	0,008	0,03	1,674	0,058	0,017	1,134	0,012	0,01
<b>D</b>	0,036	0,014	0,005	0,07	0,007	0,028	1,633	0,05	0,017	1,145	0,009	0,008
<b>E</b>	0,004	1,2	0,639	0,258	0,19	0,015	1,637	0,017	0,018	0,076	0,163	0,081
<b>F</b>	0,005	0,996	0,641	0,275	0,152	0,016	1,722	0,017	0,018	0,08	0,191	0,041
<b>G</b>	0,718	0,344	0,005	0,003	0,009	0,073	0,938	0,732	0,471	0,09	1,346	0,178
<b>H</b>	0,654	0,36	0,006	0,004	0,012	0,088	1,047	0,781	0,473	0,093	1,345	0,024

**Rojo: diferencia entre repeticiones mayor al 20%**

**PROMEDIOS**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,413	0,0045	0,084	0,02	0,0045	0,089	0,0115	1,4575	0,258	0,0425	0,006	2,013
<b>B</b>												
<b>C</b>	0,0255	0,0125	0,0045	0,0745	0,0075	0,029	1,6535	0,054	0,017	1,1395	0,0105	0,009
<b>D</b>												
<b>E</b>	0,0045	1,098	0,64	0,2665	0,171	0,0155	1,6795	0,017	0,018	0,078	0,177	0,061
<b>F</b>												
<b>G</b>	0,686	0,352	0,0055	0,0035	0,0105	0,0805	0,9925	0,7565	0,472	0,0915	1,3455	0,101

<b>H</b>											
----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**% de Positividad x duplicado**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,413	0,3185	5,9448	1,4154	0,3185	6,2987	0,81387	103,15	18,259	3,0078	0,4246	142,46
<b>B</b>												
<b>C</b>	0,0255	0,8846	0,3185	5,2725	0,5308	2,0524	117,021	3,8217	1,2031	80,644	0,7431	0,6369
<b>D</b>												
<b>E</b>	0	77,707	45,294	18,861	12,102	1,097	118,861	1,2031	1,2739	5,5202	12,527	4,3171
<b>F</b>												
<b>G</b>	48,549	24,912	0,3892	0,2477	0,7431	5,6971	70,2406	53,539	33,404	6,4756	95,223	7,1479
<b>H</b>												

Verde: Menor a 32: **NEGATIVO**  
 Amarillo: entre 32 y 51:  
**SOSPECHOSO**  
 Rojo: Mayor a 51: **Positivo**

## CAPITULO 7: DISCUSION

En esta investigación, la cantidad de machos y hembras analizados fueron diferentes a los estudiados por Molina y col (2014), ya que se observó un mayor porcentaje de hembras que de machos, con resultados de positividad serológica, teniendo en cuenta solo los animales confirmados, si bien consideramos que ambos sexos son igualmente importantes en la transmisión de la enfermedad.

Según Boeri y col (2008) el rol de la hembra es muy importante como posible transmisora de la enfermedad debido a que representaron el 84% de las muestras de su estudio, encontrando un 4.9 % de serología positiva, muy similar al presente estudio donde se analizaron 90 hembras de un total de 127 muestras (71%), con 5,5 % de serología positiva,

Con respecto a los machos, fueron solo 2 de los 10 confirmados a diferencia del estudio de Molina y col (2014), en el cual la cantidad de machos y hembras fue similar, considerando importante el dato debido a la posible transmisión a través de la orina y semen ya que los organismos se alojan en próstatas y epidídimos. Es conocida la importancia de hembras y machos caninos como posibles dispersores de brucelas en el medio ambiente a través de secreciones biológicas (Greene, 2008)

Considerando lo dicho por Green, (2008) sobre la importancia de las condiciones de alojamiento en la prevalencia de la infección, y comparando con el estudio de Molina y col (2014), estos autores, encontraron un porcentaje de positivos a RSAT del 10%, igual porcentaje de positivos encontrados con esta investigación, coincidiendo en la positividad a esta prueba serológica y sobre un total muy similar de perros muestreados (109 vs 127), aunque con la diferencia que el estudio de Molina se realizó con propietarios de unidades habitacionales con condiciones normales de higiene y en esta investigación el mayor porcentaje son animales con propietarios con precarias condiciones de alojamiento y escasos recursos, motivo por el cual asisten a la castración gratuita del quirófano municipal del Dpto de Santa Lucia.

A diferencia con Boeri y col (2008), quien no encuentra una correlación entre seropositividad y necesidades básicas insatisfechas, destacando en su investigación la falta de higiene ambiental en la mayoría de los predios, en este estudio, si bien no se encontraron asociaciones estadísticas entre seropositividad y el escaso recurso de los propietarios o la falta de higiene de las viviendas, se evidencia la enorme cantidad de perros que viven en condiciones de alojamiento sin higiene y además con hábitos de vagabundeo, situación que se pone en evidencia al ser llevados por la Fundación Patitas sin Hogar y luego de la castración ser dejados nuevamente en la calle.

En el presente estudio el 50 % de los animales muestreados tienen contacto con perros callejeros, un porcentaje menor al que encontró Molina y col. que fue del 64.2 %, aunque en este estudio un 26 % se desconoce esta situación, lo cual podría aumentar ese porcentaje y alcanzar valores similares a los encontrados por Molina y col (2014)

Con estos porcentajes se pone en evidencia el hábito peridomiciliario de los animales, importante en la transmisión de la enfermedad, siendo la transmisión social ocasional una vía de contagio frecuente ya que el olfateo y lamido de los genitales representan una forma de comunicación canina. Si bien la transmisión venérea es una de las formas de contagio entre perros sexualmente maduros, en los prepúberes la transmisión extrauterina se realiza fundamentalmente por vía oronasal (Di Lorenzo, 2012).

Al respecto López y col (2009) publicaron que el 96 % de perros positivos a RSAT tenían contacto con perros vagabundos, evidenciando la importancia epidemiológica de este hábito en la presencia de brucelosis, coincidiendo con Gardner y Reichel (1997) quienes señalan que la prevalencia parece ser más alta en perros callejeros y salvajes que en perros domésticos.

En cuanto a la edad, se observó que la seropositividad era mayor en aquellos animales que se encontraban en el rango entre 4 y 8 años, este resultado coincide con el estudio realizado por Molina y col (2014) en donde demuestra el rango de 2 a 8 años como el de mayor seropositividad. Otros estudios demuestran que Wanke y col (2008), hallaron que el rango de edad de 1 a 3 años fue el que más perros positivos presentó, y que los animales más viejos resultaban negativos, sosteniendo que la incidencia de brucelosis decrece con la edad. Para Kienner y col (2013) la edad de mayor frecuencia de presentación en ambos sexos fue 1 a 5 años, coincidiendo con los estudios anteriores.

En el presente estudio, el porcentaje de sueros de perros mestizos analizados fue del 66%, demostrando que este, por ser un estudio realizado en un centro de castración municipal, más de la mitad de los animales eran mestizos, aunque se observó un 34 % de animales de raza pura, a diferencia de López y col. en 2009 quienes publicaron que el 96% de los perros positivos a RSAT eran mestizos.

Los signos clínicos y subclínicos de la brucelosis en caninos causada por *B. canis* son variables y muchas veces confusos (Carmichael and Kenney, 1970; Flores Castro, 1981)

El presente estudio presentó un 91% de perros sin signos clínicos al momento de la toma de muestra, dato muy similar al que encontró Molina y col (2014) que fue del 96.3% coincidiendo también con Zarate y col (2014) que encontraron solo 3% de perros con signos clínicos compatibles con brucelosis al momento de la toma de muestra, en el presente estudio solo un 7% de perros presentaban algún tipo de síntoma clínico al momento de la toma de la muestra.

En el estudio realizado por Elena y col (2012) se encontró un 100% de animales reaccionantes a pruebas serológicas sin signos compatibles con brucelosis al momento de la toma de muestra coincidiendo con López (2009) quien publicó 90%.

En este estudio el 38% de los perros reaccionantes a diferentes técnicas serológicas, y de acuerdo al resultado de estas, clasificados en tres categorías, no presentaban signos clínicos. La discoespondilitis, la orquitis y los signos inespecíficos fueron los hallados con mayor frecuencia (5%). Estos datos coinciden con Hollet (2006) quien sostiene que algunos perros infectados no muestran síntomas o tienen síntomas inespecíficos.

Del 47 (%) de los animales, no se pudo conocer la sintomatología, ya que al ser animales de la calle no se encontraron para hacer el examen clínico detallado, como tampoco fue posible en algunos casos encontrar a sus dueños.

En concordancia con lo que expresa Elena y col (2012), no se observó abortos en ningún perro con suero reaccionante a pruebas serológicas, resultados disimiles a los hallados por López (2009) que encontró abortos en 2 de 3 hembras positivas (66%) y a los de Zárate (2014) que encontró abortos en 1 de 3 hembras positivas (33%).

Si bien para el diagnóstico de brucelosis se utilizan pruebas serológicas que detectan anticuerpos (Lavaroni y col. 2011) es necesaria una confirmación por otras pruebas.

En un estudio en la zona sur de la ciudad de Buenos Aires, Isturiz y col (2012) informan un 7.3% de caninos positivos a RSAT, mientras que en el presente trabajo se detectó un 8,5 % de sueros reaccionantes a cepas rugosas del género *Brucella*. Este porcentaje fue menor al hallado en un estudio realizado en la ciudad de Chamental.

En otro estudio realizado en la ciudad de Buenos Aires no se detectaron sueros reaccionantes a cepas lisas (Boeri y col (2008), al igual que ocurrió en el presente trabajo donde ningún animal resulto ser positivo a la prueba de BPA. A diferencia de Eiras y col (2014) que publican un 2.7% de reaccionantes en el conurbano sur de Buenos Aires, valores similares al 2.23% detectados por López (2009).

Esta negatividad a la prueba del BPA (100%), posiblemente sea debido a que los animales no estuvieron en contacto con animales enfermos con cepas lisas, ya que no son perros de campo.

En esta investigación, los sueros que resultaron positivos a las técnicas de RSAT, IDGA o IELISA ninguno pudo ser confirmado por hemocultivo, siendo todos los resultados negativos, a diferencia del estudio de Boeri (2008), en el cual encontró 7.3% seropositivos y aisló el agente en 3 caninos, siendo su estudio realizado sobre 219 perros de barrios y asentamientos con bajas condiciones de higiene y gran porcentaje de animales con hábitos de vagabundeo, similar a la población bajo estudio.

Isturiz y col (2012) pese a informar un menor porcentaje de seropositivos a RSAT (5%), lograron aislar brucelas sin encontrar asociación entre seropositividad a brucelosis canina y el tipo de hábitos.

En el año 2008 se realizó un relevamiento en distintos barrios y asentamientos de la ciudad de Buenos Aires arrojando un 7,3 % de animales con serología positiva por ELISA indirecto sobre 219 perros estudiados (Boeri y col., 2008). Otro estudio realizado en ese período en el partido de Lomas de Zamora (Pcia. Buenos Aires) informó una prevalencia de 10,7% de animales positivos a ELISA indirecto (López *et al.*, 2009). En este trabajo resultaron 9 animales positivos, 3 sospechosos y 33 negativos.

Los cinco sueros que resultaron negativos al RSAT y posteriormente, fueron positivas o sospechosos al ELISA, podría indicar en estos casos que los perros se encontraban en una etapa temprana de la infección, casos muy agudos de infección, (periodo de ventana), sabiendo que los anticuerpos detectables por RSAT aparecen a la cuarta semana post infección. Situación similar a lo que encontró Elena y col (2012) con estudios de PCR e IDGA, en donde las líneas de precipitación aparecen dentro de las 12 semanas pi (Wanke, 2004, Hollett, 2006) y la detección de *Brucella* por el hemocultivo resultó negativa, quizás debido a su baja sensibilidad o a que no se encontraban bacterias en sangre en ese momento

## **CAPITULO 8: CONCLUSIONES**

El presente trabajo, demuestra que la detección de anticuerpos contra cepas rugosas de *Brucella canis*, mediante las pruebas RSAT, ME RSAT, IDGA y IELISA, permitieron detectar muchos animales sin manifestaciones clínicas ni subclínicas.

A pesar que el hemocultivo es considerado la “técnica de oro”, para la confirmación indiscutible de la enfermedad, en todos los perros que resultaron serológicamente positivos a cuatro técnicas diferentes, el aislamiento fue negativo, posiblemente debido a la cronicidad de la enfermedad donde la bacteriemia es intermitente (Johnson and Walker, 1982; Carmichael and Greene, 2006)

La técnica de IELISA por ser una técnica más sensible, permitió detectar un mayor porcentaje de perros infectados, esta técnica tiene muchas ventajas, aunque también desventajas, fundamentalmente para la implementación en un Laboratorio que no sea de derivación ni de referencia como es el de la provincia de San Juan, estas desventajas son entre otras, el costo y la casi imposibilidad de contar con todas las muestras juntas en el mismo momento, para poder enviarlas al SENASA.

La variable epidemiológica más importante es la gran cantidad de animales callejeros, y el vagabundeo incluso en aquellos animales con propietario. En este trabajo tuvo mucha relevancia esta situación, no solo porque permite la presentación y el mantenimiento de dicha enfermedad, si no porque es sumamente difícil y en algunos casos resultó imposible, volver a encontrar a estos animales para realizarles alguna otra prueba serológica, tratamiento y seguimiento.

Deberíamos como profesionales de la salud, educar a los propietarios sobre enfermedades zoonóticas, con el doble propósito de prevenir enfermedades en animales y

humanos. Tarea que compete, no solo a Médicos Veterinarios privados, sino principalmente a los organismos públicos oficiales vinculados con la Salud Pública.

En ninguno de los casos confirmados los perros manifestaron sintomatología compatible con Brucelosis, aun siendo positivos a más de una técnica serológica. Esta situación de perros asintomáticos o de estado subclínico de enfermedad, podría estar enmascarando el rol de enfermos crónicos o asintomáticos en los pacientes, impidiendo la detección de casos infectados por parte de los colegas del medio y posterior diagnóstico de la enfermedad.

Sería importante continuar con el muestreo para detectar posibles nuevos casos con anticuerpos o lograr el aislamiento del microorganismo como confirmación y realizar más diagnósticos serológicos en animales que presenten síntomas compatibles.

Este estudio fue útil para generar datos sobre el estado actual de brucelosis en San Juan, debido a que no se encontraron estudios previos en la provincia, y también para generar conciencia en los colegas de la importancia de la enfermedad en la Salud Pública

## **CAPITULO 9: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

**Acha, P. y Szyfres, B (1986).** *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.

**Acha, P. y Szyfres, B (2003).** *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.

**Alman, D., Bland, J.M (1994).** Statistics note, diagnostic test 1: sensitivity and specificity. *British Medical Journal* 308, 1552

**Al-Nakkas, A., Mustafa, A.S, Wright, S.G (2005)** Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis in Kuwait *Journal of Medical Microbiology.*54 :727-730.

**Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M (1988).** The techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

**Álvarez-Hernández, N.E. Díaz-Flores M., Ortiz-Reynoso (2015)** M. Brucelosis, una zoonosis frecuente Rev Med Inv 2015; 3:129-33 - DOI: 10.1016/j.mei.2015.07.002 <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-medicina-e-investigacion-353-articulo-brucelosis-una-zoonosis-frecuente-S2214310615000382#elsevierItemBibliografias>

**Anderson, G.I., Binnington, A.G (1983)**. Discoespondylitis and orchitis associated with high *Brucella* titre in a dog. Canadian Veterinary Journal. 24 : 249-252.

**Angrimani, et al (2016)**. *The influence of canine brucellosis on morphofunctional features of epididymal spermatozoa: case report*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.68, n.6, p.1449-1452.

**Arese, A., Cravero, S., Boschioli, M., Campos, E., Samartino, L., Rossetti, O (1999)**. Uso de una proteína recombinante de *Bucella abortus* para el diagnóstico de la brucelosis en diferentes animales. Revista Argentina de Microbiología. 31: 36-39.

**Ayoola, M.C.; Ogugua, A.J.; Akinseye, V.O.; Joshua, T.O.; Banuso, M.F.; (2016)**. *Seroepidemiological survey and risk factors associated with brucellosis in dogs in southwestern Nigeria*. Pan African Medical Journal, v.23, n.29, p.1-8,

**Baily, G.G., Krahn, B.J., Drasar, B.S., Stoker, N.G (1992)**. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95 : 271-275.

**Baldi, P.C., Wanke, M.M., Loza, M.E., Monachesi, N., Fossati, C.A (1997)**. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serun antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. Veterinary Microbiology. 51: 273-281.

**Banegas, E (2003)** *Prevalencia de la Brucelosis canina en la ciudad de Vallegrande*. Tesis de Grado Médico Veterinario zootecnista. Universidad Autónoma Gabriel Rene Moreno, Santa Cruz, Bolivia. Consultado el el 22 de nov de 2016 desde: [http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc\\_tesis/GALVIS,ERWIN-20101123092157](http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/GALVIS,ERWIN-20101123092157).

**Baruta, D.A. Ardoino, S.M., Brandan, J.L. Riesgo, S., Oriani, D., Mariano, E.L (2003)**. Estudio seroepidemiológico de brucelosis canina en General Pico, Provincia de La Pampa, Argentina. Veterinaria 5: 11-16.

**Bicknell, S.R and Bell, R.A (1979)** *Brucella abortus* in the bitch: subclinical infection associated with urinary excretion. Journal of Hygiene. Cambridge. 82:249-253.

**Blasco, J. y Gamazo, C (1994).** Brucelosis animal. Investigación y ciencia. 218:56-62. U.S

**Boeri, E., Escobar, G.L., Ayala, S.M., Sosa-Estani, S., Lucero, N.E (2008).** Brucelosis canina en perros de la ciudad de Buenos Aires. Medicina (Buenos Aires). 68: 291-29

**Boletín de vigilancia epidemiológica de la rabia (1999)** n°3. Instituto de zoonosis urbanas, Ministerio de Salud, Provincia de Buenos Aires. 1:3,5.

**Boletín epidemiológico periódico N°33 (BEP) Ministerio de Salud República Argentina (2010).** *Brucelosis*. Consultado el 23 de septiembre de 2016 desde: [http://www.msal.gov.ar/saladesituacion/boletines\\_epidemiologia/pdfs/boletin\\_Brucelosis.pdf](http://www.msal.gov.ar/saladesituacion/boletines_epidemiologia/pdfs/boletin_Brucelosis.pdf).

**Borie, C.; Cepeda, R.; Villarroel, M.; De Los Reyes, M (2002).** Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Arch. Med. Vet.* 34 (1): 111-116.

**Boschioli, M.L., Cavero, S.L., Arese, A.I., Campos E., Rossetti, O.L (1997).** Protection against infection in nice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant. *Infection and Immunity*. 65 : 798-800.

**Bowden, R.A., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., Bernard, S., Dubray G (1995).** Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.*, 63 : 3945-3956.

**Brower, A.; Okwumabua, O.; Massengill, C.; Muenks, Q.; Vanderloo, P.; Duster, M.; Homb, K.; Kurth, K (2007)** Investigation of the spread of *Brucella canis* via the interstate dog trade. *International Journal of Infectious Diseases: 11* (5):454-8.

**Cadmus, S.; Adesokan, H.; Ajala, O.; Odetokun, W.; Perrett, L.; Stack, J (2011)** Seroprevalence of *Brucella abortus* and *B.canis* in household dogs in southwestern Nigeria a preliminary report *Jl S. Afr. Vet. Assoc.* : 82 (1) :56-57.

**Carmichael, L.E (1966).** Abortions in 200 beagles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.149 :1126.

**Carmichael, L.E (1976).** Canine brucellosis : an annotated review selected cautionary comments. *Theriogenology*, 6(2-3): 105-116.

**Carmichael, L.E, Kenney, R.M (1968).** Canine abortion caused by *brucella canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.152 : 605-616.

**Carmichael, L.E, Kenney, R.M (1970).** Canine brucellosis : The clinical disease, pathogenesis, and immune response. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 156 : 1726-1734.

**Carmichael, L.E., Joubert, J.C (1987).** A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *The Cornell Veterinarian*. 77 : 3-12

**Carmichael, L.E Kenney, D.V (1989).** *Canine abortion caused by Brucella canis*. *J Am. Vet. Med. Assoc.* 152 : 605-616

**Carmichael, L. ; Zoha, S. ; Flores Castro, R (1984).** Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis : dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Dev. Biol. Stand.* 56 :371-83.

**Carmichael, L.E (1990).** *Brucella canis*. In : Nielsen, K., Duncan, J.R., eds. *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, Fl, USA, pp. 335-350.

**Carmichael, L (1996).** Canine Brucellosis: A diagnostician's dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)* 11 :161-165.

**Carmichael, L. ; Joubert, J (1988).** Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Veterinary* : (78) : 63-73.

**Carmichael, L. ; Joubert, J. ; Jones ; L (1989).** Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Vet Microbiol.* 19 :373-387.

**Carmichael, L.E., Greene, C.E (2006).** Canine brucellosis. In: Greene C.E., editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Philadelphia : Elsevier Saunders, pp. 369-381.

**Carmichael, L.E., Shin (1996)** Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)* 11: 161-165.

**Castrillón-Salazar, L.; Giraldo-Echeverri, C.; Sánchez-Jiménez, M.; Olivera-Angel, M (2013)**. Factores asociados con la seropositividad a *Brucella canis* en criaderos caninos de dos regiones de Antioquia, Colombia. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro: 29* (10):1975-1987. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00133013>.

**Castro, H.; González, S.; Prat, M (2005)**. Brucelosis: Una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana: 39* (2): 203-216.

**Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2005)** Brucellosis (*Brucella melitensis*, *abortus*, *suis* and *canis*). Recuperado el 03 de febrero de 2016 en [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis\\_t.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_t.htm)

**Center for Security and Public Health (CSPH) Iowa State University (2012)** Canine Brucellosis: *Brucella canis* Recuperado el 03 de febrero de 2016 en [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_g.htm)

**Chacón, Diaz, C.; Altamirano silva, P.; González, Espinosa, G.; Medica, M.C.; Alfaro-Alarcón, A.; Bouza-Mora, L.; Jiménez, Rojas, C.; Wong, M.; Barquero-Calvo, E.; Rojas, N.; Guzman-berri, C.; Moreno, E.; Chaves-Olarte, E (2015)** *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infection and Immunity*, v.83, n.12, p.4861-4670.

**Chassagnade, M.; Chiaretta, A.; Witowski, E.; Martin, V., (2008)** Enfermedades zoonóticas que afectan la salud humana y animal en el departamento de Rio segundo (2005-2006) I Reunión conjunta de sociedades de biología de la República Argentina, Huerta grande.

**Cloekaert, A., Baucheron S., Viscaíno N., Zygmunt, M.S (2001)**. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8 : 772-775.

**Cloekaert, A., De Wergifosse, P., Dubray, G., Limet, J.N (1990)**. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies : immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and immunity*. 58 : 3980 - 3987.

**Cloekaert, A., Viscaíno, N., Paqut, J.Y., Bowen, R.A., Elzer, P.H (2002).** Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary Microbiology*. 90 : 229-247

**Cloekaert, A., Zygmunt, M.S., De Wergifosse, P., Dubray, G., Limet, J.N (1992).** Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 138:1543-1550.

**Crespo León, F (1994).** Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties. París, Francia.

**Cotê, E (2010).** *El consultor en la clínica veterinaria perros y gatos*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Intermédica.

**De la Torre, F.; Arestegui, M.; Peralta, L (2010).** *Relevamiento epidemiológico de brucelosis canina en perros de la ciudad de Rosario, Santa Fe*. XI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR, Casilda.

**Del Águila Padilla, J (2007).** *Detección de anticuerpos contra Brucella canis en 5 criaderos caninos del departamento de Guatemala por medio de la prueba de aglutinación rápida en placa 2- mercaptoetanol (PARP-ME)*. Tesis de grado Médico Veterinario. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

**Delgado M.G., Armoriaga C., Miranda N (2008).** Diagnóstico serológico de brucelosis canina en la ciudad de San Luis. XVII Reunión científica-técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. E-17.

**Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., Cheville, N.F (1990).** Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. *Infection and Immunity*. 58:2320-8.

**Di Lorenzo, C (2012).** *Vías de transmisión de la brucelosis canina en infecciones naturales. Responsabilidad profesional del veterinario para su control y erradicación*. XIX Reunión Científico Técnica Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, Buenos Aires.

**Di Rienzo J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. InfoStat versión (2016).** Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Consultado el 10 de octubre de 2016 en <http://www.infostat.com.ar>

**Ebani, V.; Cerri, D.; Fratini, F.; Bey, R.; Andreani, E (2003).** Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis* *New Microbiologica*: (26): 65-73.

**Eiras, D.; Scodellaro, C.; Vezzani, D.; López, G.; Boero, C.; Sánchez, R (2014).** Diagnostico serológico de brucelosis en perros del conurbano sur bonaerense. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes: IX* (2): 26-27.

**Estein, S.M., Baldi, P.C., Bowden, R.A (2002)** Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 43: 45-47.

**Fiorimanti, M.; Richardet, M.; Espinosa, L.; Scriveranti, Y.; Martin, V., (2014)** *Abordaje interdisciplinar de zoonosis en caninos del Centro de Reinserción Municipal*. III Congreso Panamericano de Zoonosis. VIII Congreso Argentino de Zoonosis, La Plata.

**Flores Castro, R.; Carmichael, L (1981).** Brucelosis causada por *Brucella canis*. *Ciencia Veterinaria*: 3. 178-197.

**Flores Castro, R., Carmichael L.E (1981).** *Brucella canis* Infection in dog: treatment trials. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 23:75-79

**Flores Castro, R.; Carmichael, L.E (2008).** *Brucelosis causada por Brucella canis*. Consultado el 22 de febrero del 2017. [www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c06.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c06.pdf).

**Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacquets, I., Cloeckert, 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: 2688-93.

**Gaia, O. ; Francois, S. ; Rondelli, F. ; Fain Binda, V.; Gherardi, S.; Dídoli, G.; Colle, N.; Fain Binda, J.; Marro, A.; Molinari, C.; Hrdalo, J (1999).** *Alta incidencia de enzootias en perreras*. Jornadas de divulgación Técnico Científicas, Casilda.

**Garcia Carrillo, C (1990).** La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. Office International des Epizooties. Paris, Francia.

**Gardner, D.; Reichel, M., (1997)** No evidence of *Brucella canis* infection in New Zealand dogs *Surveillance* : 24 (3) :17-18.

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

**Goldbaum, F.A., Leoni, J., Wallach, J.C., Fossati, C.A (1993).** Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2141-2145.

**Goldbaum, F.A., Velikovsky, C.A., Baldi, P.C., Mortl, S., Bacher, A., Fossati, C.A (1999).** The 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp., an antigen useful for diagnosis, is a lumazine synthase. *J. Med. Microbiol.* 48: 833-839.

**Gorordo, M.; Adrién Rüeegger, M.; Luciani, M (2014).** *Determinación de anticuerpos contra Brucella sp. y Leptospira interrogans en caninos de distintas localidades del sur de Santa Fé.* XV Jornadas de Divulgación Técnico científicas-II Jornada Latinoamericana, Casilda.

**Greene, C (2008).** *Enfermedades infecciosas del perro y el gato.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Intermédica.

**Greene, C.; Carmichael, L (2012)** *Canine Brucellosis* En: Greene, C. Infectious diseases of the dog and cat. Fourt Edition Saunders Elsevier

**Guarino, A., Serpe, L., Fusco, G., Scaramuzzo, A., Gallo, P (2000).** Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR *Veterinary Record.*147: 634-636.

**Guzmán-Hernández, R. Contreras-Rodríguez, A. Ávila-Calderón E., Morales-García M (2016)** Brucellosis: zoonosis de importancia en México *Rev chilena Infectol* 33 (6): 656-662)

**Harold, J.H (1941).** *Brucellosis (undulant fever) Clinical and Subclinical.* Paul B. Hoeber, Inc. New York. First edition.

**Harris, A.M., Horton, M.L., Letschr, R.M., McConnel, E.E., New, A.E (1974).** Enzootic *Brucella canis* - an occult disease in a research canine colony. Laboratory animal science. 24 : 796-799.

**Hill, W.A., Van Hoosier, G.L., McCormick, N (1970).** Enzootic abortion in a canine production colony. Epizootiology, clinical features, and control procedures. Laboratory animal care. 20 : 205-208.

**Hollet, R.B (2006).** Canine brucellosis. Outbreaks and compliance. Theriogenology. 66 : 575-587.

**Iachini, R.H., Boeri, E.J., Castro, J., Gramajo, F.O. 2004(b).** Prevalencia serológica de brucelosis canina en diferentes barrios de la ciudad de Buenos Aires. Comunicación libre A4, Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires.

**Iachini, R.H., Gramajo, F.O. Cicuttin, G.L. Snaiderman, L.M. 2004(a).** Prevalencia serológica de brucelosis canina en barrios carenciados de la ciudad de Buenos Aires. Comunicación libre A4, Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires.

**Iachini, R (2012).** *Brucelosis canina: Evaluación serológica realizada en el instituto Pasteur de la ciudad de Buenos Aires.* XIX Reunión Científica Técnica Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

**Isturiz, M.; Pujol, L.; Gonzales Lebrero, C.; Mora, M.; Rodríguez Eugui, J.; Silva, D.; Iachini, R (2012).** *Estudio serológico de brucelosis canina en barrios de la zona sur de la ciudad de buenos aires (CABA).* III encuentro internacional sobre enfermedades olvidadas y XV simposio sobre control epidemiológico de enfermedades transmitidas por vectores, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

**Informe Técnico N° 02 Año 2013 (IT02/2013).** Ministerio de Salud de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. *Resumen ejecutivo. Brucelosis: puntualizaciones respecto de población expuesta a B. canis.* Recuperado el 09 de febrero de 2016 en [http://deis.tierradelfuego.gov.ar/index\\_htm\\_files/IT\\_02\\_2013\\_Puntualizaciones\\_Brucelosis.pdf](http://deis.tierradelfuego.gov.ar/index_htm_files/IT_02_2013_Puntualizaciones_Brucelosis.pdf).

**Johnson, C. ; Bull, R. ; Schirmer, R (1983).** Peripheral lymphocyte function in dogs with *Brucella canis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: (4): 425-431.

**Johnson, C.A., Walker, R.D (1992).** Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 14 (763/767), 770-772.

**Joklik, W.; Willet, P.; Amos, B.; Wilfert, C (1997)** *Microbiología* (20 ed.). Montevideo, Uruguay: Editorial Médica Panamericana.

**Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Chiebao, D.P., Megid, J., Salgado, V.R., Richtzenhain, L.J (2007b).** A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*. 67 : 1203-1210.

**Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Chiebao, D.P., Salgado, V.R., Megid, J., Richtzenhain, L.J (2007c).** A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*. 68 : 1260-1270.

**Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Megid, J., Salgado, V.R., Richtzenhain, L.J (2009).** Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Research in Veterinary Science*. 86 : 22-26.

**Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Salgado, V.R., Megid, J., Richtzenhain, L.J (2010).** Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. *Veterinary Record*. 167 : 96-99.

**Keid, L.B., Soares, R.M., Vieira, M.R., Megid, J., Salgado, V.R., Vasconcellos, S.A., da Cota. M., Richtzenhain, L.J (2007<sup>a</sup>).** Diagnosis of canine brucellosis : comparison between serological and microbiological test and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Veterinary Research Communications*. 31: 951-965.

**Kiener, M.; Poitevin, A.; Bonaparte, J.; Barolin, J.; Malano, G.; Bordon, Y.; Sguerzo, W.; Delgado, A.; Refj, P.; Romano, G (2014).** *Estudio preliminar de seroprevalencia de Brucella canis en perros de La Francia provincia de Córdoba.* Recuperado el 15 de marzo de 2017 en [http://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/b\\_canis.pdf](http://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/b_canis.pdf).

**Lavaroni, O.; Vera, E.; Cabrera, C.; García, N (2011).** Estudio serológico en alumnos de la facultad de ciencias veterinarias de esperanza en el año 2010. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias: 10 (2): 8-12.*

**López, G.; Ayala, M.; Efron, A.; Gómez, C.; Lucero, N (2009)** A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. *Revista Argentina de Microbiología: 41: 97-101.*

**Lucero, N.; Escobar, G.; Ayala, S.; López, G (2002)** Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs *Journal of Medical Microbiology: 51 (8): 656-660.*

**Lucero, N.; Escobar, G.; Ayala, S.; Jacob, N., (2005)** Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis* *Journal of Medical Microbiology: 54: 457-461*

**Lucero, N.; Jacob, N.; Ayala, S.; Escobar, G.; Tuccillo, P.; Jacques, I (2005)** Unusual clinical presentation of brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology: 54: 505–508.*

**Lucero, N (2012).** *Brucelosis canina: Una zoonosis urbana emergente.* XIX Reunión Científico Técnica Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Diagnóstico XIX Reunión Científico Técnica – Buenos Aires 7/12/12

**Lucero, N.E (1996).** *Brucella.* Microbiología biomédica Eds. J.A. Basualdo, C.E. Coto, R.A de Torres, ATLANTE, Buenos Aires.

**Lucero, N.E. 2004.** Diagnostico serológico y bacteriológico de brucelosis humana y canina. Temas de Zoonosis II. Asociación Argentina de Zoonosis. Cap 21, pp. 159-164

**Marín, C.M., Lopez-Goñi, I., Blasco, J.M (2002).** Etiología, diagnóstico bacteriológico y molecular. *Ovis. 82: 19-38.*

**Martín, V.; Bagnis, G.; Esposito, N (2010).** *Determinación de riesgo epidemiológico de brucelosis en estudiantes de medicina veterinaria.* VI Jornadas Intern. Salud Pública, Córdoba.

**Martín, V.; Molina, I.; Vissio, C.; Richardet, M.; Fiorimanti, M.; Espósito, N.; Arrieta, E.; Ceballos, V.; Aguirre, V.; Gatti, C.; Bagnis, G (2015).** *Seroprevalencia de Brucella spp en estudiantes de Medicina Veterinaria (UNRC).* XVII Simposio Internacional sobre Enfermedades Desatendidas Mundo Sano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

**Marzetti, S.; Carranza, C.; Roncallo, M.; Escobar, G.; Lucero, N (2013).** Recent trends in human *Brucella canis* infection. *CIMID: 36* (1):55-61.

**Matar, G.M., khneisser, I.A., Abdelnoor, A.M (1996).** Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of target sequence on the 31-Kilodalton Brucella antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology.* 34: 477-478.

**Mateu de Antonio E.M., Martin M., Casal, J (1994).** Comparison of serologic test used in canine brucellosis diagnosis. *Journal of veterinary Diagnostic Investigation.* 6: 257-259.

**Mateu de Antonio E.M., Martin M., Soler, M (1993).** Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dog. *American Journal of Veterinary Research.* 54: 1043-1046.

**Mayfield, J.E, Bricker, B.J. Godfrey, H., Crosby, R.M., Knight, D.J., Halling, S.M., Balinsky, D., Tabatabai, L.B (1988).** The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Bucella abortus* protein. *Gene.* 63: 1-9.

**Mc Farlane, D., Salisbury, RM., Osborne, H.V., Jebson, J.L (1952).** Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *The Australian Vererinary Journal.* 28: 221-226.

**Méndez R, Iván Alberto, Diego Mauricio Trujillo C, Cristian Camilo , Duque S, Edward Javi er Acero M, Luis Ángel Cabrera, Diana Patricia Pachón B (2013)** Seroprevalencia de Brucella spp en estudiantes de Medicina Veterinaria, Bogotá, Colombia. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud Vol.45 No.2 mayo-agosto* <http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v45n2/v45n2a06.pdf>

**Miceli, A.; Di Lorenzo, C.; Scuffi, A.; Cabral, M (2015)** *Brucelosis canina:Casuística del laboratorio de inmunología de la facultad de ciencias veterinarias UNLP Período 2013-2015.* Recuperado el 09 de febrero de 2016 en

<http://www.jornadascuyanas.com/archivos/posters/2015/trabajo%20casuistica%20cuyo%20%281%29.pdf>

**Ministerio de Salud de Salud de la Nación (2007).** Guia Medica Brucelosis. Consultado el 23 de abril de 2018  
<http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>

**Ministerio de Salud de la Nación (2007).** Manual de Normas y procedimientos para vigilancia, prevención y control de la rabia. 2007  
[http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000793cnt-2012-03-15\\_rabia-manual.pdf](http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000793cnt-2012-03-15_rabia-manual.pdf)

**Miranda, A.; Báez, N (2005).** *Serodiagnóstico en Brucelosis Canina: Análisis comparativo entre las técnicas de aglutinación rápida en placa e inmunodifusión en gel de agar.* XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas, FCV, UNNE, Corrientes.

**Molina, I; Fiorimanti, M.; Gregori, S.; Escobar, G.; Lucero, N.; Trangoni, M.; Cravero, S.; Elena, S.; Bagnis, G.; Espósito, N.; Martin, V (2014).** *Aborto producido por Brucella suis biovar 1 en un criadero canino.* XV Jornadas de La Asociación Argentina de Microbiología, Córdoba.

**Molina, M (2017)** *Seroepidemiología de Brucelosis en Caninos de la Ciudad de Chamical.* Tesis para acceder al título de Magister en Anatomía y Fisiología Veterinaria

**Moore, J.A (1969).** *Brucella canis* infection in dog. Journal of the American Veterinary Medical Association. 155 : 2034-2037.

**Moore, J.A., Bennett, M (1967).** A previously undescribed organism associated with canine abortion. The Veterinary Record 80:604-605.

**Morata, P., Queipo-Ortuño, M.I., Colmenero, J.D (1988)** Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. Journal of Clinical Microbiology 36: 2443-2446.

**Moreno, E (1998).** Genome evolution within the alpha *Proteobacteria*: ¿why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? FEMS Microbiology Reviews 22: 255-275.

**Moreno, E., Moriyón, I (2001).** Genus *Brucella* In: “The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community” Dwordin M., editor in chief. Springer-Verlag, New York. ISBN: 0-387-14254-1.

**Moreno, E., Speth, S.L., Jones L.M., Berman, D.T (1981).** Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infection and Immunity*. 31 : 214-222.

**Moriyón, I., Díaz, R., Lopez-Goñi, I (2001).** Bacteriología del género *Brucella*. Pp.21-30. In: Manual de Brucelosis. Editado por Rodríguez Torres y col. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

**Moriyón, I., Lopez-Goñi, I (2002).** Taxonomía, estructura antigénica y características genéticas de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*. *Ovis*. 82 : 55-72.

**Morse, E.V (19519).** Canine brucellosis- a review of the literature. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 119 : 304-309.

**Myers, D.M., Jones, L.M., Varela Diaz, V (1972).** Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion test in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Applied Microbiology*. 23 : 894-902.

**Myers, D.M., Varela Diaz, V (1980).** Serological and bacteriological detection of *Brucella canis* infection of stray dogs in Moreno, Argentina. *The Cornell Veterinarian*. 70 : 258-265.

**Nielsen, K. ; Smith, P. ; Widdison, J.; Gall, D.; Kelly, L.; Kelly, W.; Nicoletti, P (2004).** Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O : 9 and *Escherichia coli* O157 : H7. *Vet Microbiol*. 100 : 25–30

**Nielsen, K., Smith, P., Conde, S., Draghi de Benitez, G., Gall, D., Halbert, G., Kenny, K., Massengill, C., Muenks, Q., Rojas, X., Perez, B., Samartino, L., Silva, P., Tollersrud, T and Jolley, M (2004).** Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B.ovis*, *B.canis*, and *B. abortus* RB51

exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *J. Immunoassay & Immunochemistry*. 25 : 171-182.

**OIE (2009)**. *Ovine epididymitis (Brucella ovis)*. Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties. 5th ed. Paris, pp. 1-14 (Chapter 2.4.1.)

**Obregon Fuentes, (2017)** <http://www.who.int/es/news-room/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>

**Perez Sancho, M (2014)**. Aplicación de nuevas estrategias en el diagnóstico y profilaxis de la brucelosis producida por *Brucella melitensis* en rumiantes domésticos Tesis Doctoral. Univ Compl de Madrid) <https://eprints.ucm.es/28571/1/T35782.pdf>

**Philippon, A., Roumy, B., Renoux, G (1969)**. Un cas de brucellose canine à *Brucella abortus*. Bulletin de L Académie Vétérinaire de France. XLII : 923-927.

**Piampiano, P., Mc Leary, M., Young, L. M., Janner, D (2000)**. Brucellosis unusual presentations in two adolescent boys. *Pediatric Radiology*. 30. 355-357.

**Public Health Agency of Canada (PHAC) (2001)** Material Safety Data Sheets Recuperado el 15 de marzo de 2017 en <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/index-eng.php>

**Queiroz de oliveira, R (2008)**. *Brucelose canina: Revisão de Literatura*. Tesis de especialización en clínica médica de pequeños animales. Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Recife, Brasil.

**Queipo-Ortuño, M.I., Morata, P., Ocón, P., Manchado P., Colmenero, J.D (1997)**. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay *Journal of Clinical Microbiology* 35: 2927-2930.

**Ramaciotti, F (1978)**. Aislamiento de *Brucella canis* efectuado por primera vez en la República Argentina con transmisión humana. *Revista de Medicina Veterinaria (Bs. As.)*. 59 (2).69-73

**Ramaciotti F (1980)** Primer aislamiento de *Brucella canis* en humano por hemocultivo efectuado en la República Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria (Bs. As.)*. 61 (1): 49-54

**Ramírez López, H (2005).** *Prevalencia de brucelosis canina en dos distritos de la Provincia Constitucional del Callao.* Tesis de grado Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor San Marcos, Lima, Perú.

**Reyes, E.; López, G.; Ayala, S.; Hunter, G.; Lucero, N (2012).** Monitoring infected dogs after a canine brucellosis outbreak. *CIMID*: 35 (6):533-537.

**Rossetti, O.L., Arese, A.I., Boschioli, M.L, Cravero, S.L.** 1996. Cloning of *Brucella abortus* and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein : potential use for diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:165-169.

**Ruiz-Castañeda, M (1954).** Brucelosis. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F.

**Saegusa, J., Ueda, K, Goto, Y., Fujiwara, K.** 1977. Ocular lesions in experimental canine brucellosis. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 39 : 182-185.

**Sanchez Jimenez, M. et al (2013)**

<https://www.researchgate.net/publication/260314763> Infectio · October 2013 DOI: 10.1016/S0123-9392(13)70731-8

**Sala de Situación de Salud (SSDS). Ministerio de Salud de La Rioja (2012).** *Análisis sobre eventos priorizados provincia de La Rioja a la semana epidemiológica 3 – Brucelosis-*. Recuperado el 09 de febrero de 2018 en <http://www.anlis.gov.ar/cnrl/wp-content/uploads/2014/10/PROVINCIA-DE-LA-RIOJA.pdf>

**Sanmartino, L.; Sanchez, L.; Frigeri, P.; Monasterolo, M (2013).** Análisis de incidencia de Brucelosis canina en la ciudad de La Punta, San Luis. *Veterinaria Cuyana*: 7 y 8: 18-20.

**Schiafino, L.; Pirles, M (2012).** *Determinación de brucelosis canina en el municipio de Los Molinos.* III encuentro internacional sobre enfermedades olvidadas y XV simposio sobre control epidemiológico de enfermedades transmitidas por vectores, ciudad Autónoma de Buenos Aires.

**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: 375-82.

**Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al-Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., De B.K (2010).** *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 801-808.

**Serikawa, T.; Kondo, Y.; Takada, H.; Yamada, J (1984)** Head to head type auto-spermagglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucella canis* infection. *Jpn. J. Vet. Sci:* (46): 41-48.

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

**Shin, S.J., Carmichael, L.E.** 1999. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. In : Carmichael, L (Ed.) *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA (<http://www.ivis.org>).

**Soloaga, R.; Salinas, A.; Poterallo, M.; Margari, A.; Suar, B.; Lucero, N.; Almuzaea, M (2004).** Bacteriemia por *Brucella canis*: Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Revista Argentina de Microbiología:* (36): 81-84.

**Suárez-Esquivel, M. Ruiz-Villalobos, N. Jiménez-Rojas, C. Barquero-Calvo, E. Chacón-Díaz, C. Viquez-Ruiz, E (2017)** *Brucella neotomae* infection in humans, *Emerging Infectious Diseases*. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). Vol. 23, No. 6, June 2017 Costa Rica DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2306.162018>

**Sung-Il Kang; Moon Her; Jong Wan Kim; Ji-Yeon Kim; Kyung Yuk Ko; Yun-Mi Ha; Suk Chan Jung (2011)** Advanced Multiplex PCR Assay for Differentiation of *Brucella* Species. *Applied and environmental microbiology:* 77 (18): 6726–6728.

**Taul, L.K., Powell, H.S., Baker, O.E (1967).** Canine abortion due to an unclassified gram-negative bacterium. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician.* 7: 543-544.

**Thrusfield, M (1990).** Epidemiología Veterinaria. España. Editorial Acribia S.A.

**Thrusfield, M (2007)** Veterinary Epidemiology Blackwell Science 3rd ed. Oxford, UK

**Tilley, L.; Smith, F (2008).** *Blackwells La consulta veterinaria en 5 minutos canina y felina.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Intermédica.

**Tuемmers Christian, Lüders Carlos, Rojas Claudio, Serri Michel, Castillo Carolina y Espinoza Rodrigo (2013)** *Detección de Brucella canis por método de inmunocromatografía en perros vagos capturados en la ciudad de Temuco, Chile, 2011* Disponible en: [-http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S07161018201300040000](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S07161018201300040000) Rev. Chil infectol vol.30 no.4 Santiago

**Varela Diaz, V.; Myers, D (1979)** Ocurrence of antibodies to *Brucella canis* in rural inhabitants of Corrientes and neuquen provinces, Argentina *American journal of tropical medicine and hygiene:* 28 (1): 110-113.

**Wallach, J.C., Giambartolomei G.H., Baldi, P.C., Fossati, C.A.** 2004. Human infection with M- strain of *Brucella canis*. *Emerging Infectious Diseases* Vol 10 (1): 146-148.

**Wanke M (2004).** Canine brucellosis *Anim Reprod Sci:* (82-83):195-207

**Wanke MM, Delpino MV, Baldi PC (2002).** Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet. Microbiol.* 88 : 367-375.

**Wanke, M.M., Delpino, M. V., Baldi, P. C (2006).** Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). *Theriogenology.* 11: 34-57.

**Wanke, M.; Baldi, P.; Loza, M.; Delpino, M.; Monachesi, N.; Comercio, E (2008).** *Canine brucellosis in argentina: A retrospective study of 731 suspected cases.* VI international symposium on canine and feline reproduction & VI bienal european veterinary society for small animal reproduction congress, Vienna.

**Weber, A., Krauss, H (1977).** Complement fixation test for the detection of *Brucella canis* infection in dog. Zentralblatt Veterinarmedizin. 24B: 746- 752.

**Witowsky, E.; Martin, V.; Suarez, A.; Rodriguez, N.; Esposito, N (2008).** *Enfermedades zoonóticas en humanos y perros en función de cambios sociales y ambientales. Córdoba. Argentina. III Congreso Latinoamericano de zoonosis. IV Congreso argentino de zoonosis. Ciudad Autónoma de Buenos Aires*

**Young, E.J (1995).** An overview of human brucellosis Clinical infectious Diseases 21 : 283-289.

**Yu, W.L, Nielsen K. 2010.** Review of detection of *Brucella* spp. By polymerase chain reaction. Croatian Medical Journal 51 (4): 306-313.

**Zarate, J.; López, A.; Hasan, D.; Celestino, C.; Lucero, N (2014).** Hallazgos de brucelosis en perros del Municipio de Nogoyá, provincia de Entre Ríos. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas emergentes: IX (3): 7-12.*

**Zanini, F.; Leiva, D.; Fernandez, R.; Bergagna, H.; Elissondo, M (2013).** Manejo de las poblaciones caninas urbanas en Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas emergentes: VIII (2):20-25.*

**Zoha, S.J., Carmichael, L.E (1982).** Serological responses of dog to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). Veterinary Microbiology. 7 : 35-50.

**Zoha, S.J., Walsh, R (1982).** Effect of a two-stage antibiotic treatment regimen on dogs naturally infected with *Brucella canis*. Journal of the American Veterinary Medical Association. 180 : 1474-1475.

**Zylberman, V., Craig, P.O., Klinke, S., Braden, B.C., Cauerhff, A., Goldbaum, F.A (2004).** High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. Lumazine synthase. The Journal of Biological Chemistry. 279: 8093- 8101.

## **Anexo**

Aspectos clínicos y subclínicos de la Brucelosis Canina en San Juan  
Esp. Med.Vet. Maria Virginia Carrillo

INDV	interpre	NOMB	F DE EX	PROPII	SEXO	EDAD	RAZA
1	sano	nina	#####	merca	hembra	3 años	mestiza
2	confirm	coca	#####	merca	hembra	6 años	mestiza
3	sano	lola	#####	no se s	hembra	5 1/2 años	mestiza
4	sano	no se s	#####	no se s	macho	4 1/2 años	fox terrier
5	sano	pila	#####	avelin	hembra	3 años	caniche
6	sano	no se s	#####	nuñez	hembra	5 1/2 año	mestiza
7	confirm	no se s	#####	leiva d	hembra	7 años	mestiza
8	sano	blanca	#####	leiva d	hembra	6 1/2 año	tipo siberiano
9	sano	no se s	#####	leiva d	hembra	4 años	boxer
10	sano	no se s	#####	nuñez	hembra	5 años	mestiza
11	sano	odin	#####	muñoz	macho	2 años	tipo vpi
12	sano	Negra	#####	nora g	hembra	3 años	mestiza
13	sano	luli	#####	nora g	hembra	5 años	tipo dalmata