

## ESTUDIO SOBRE *Brucella canis* EN MÉXICO

M.V.Z. RICARDO FLORES C.<sup>1</sup>  
M.V.Z. RAMIRO SEGURA L.<sup>1</sup>

### Resumen

El presente trabajo se realizó con objeto de conocer la posible presencia de *Brucella canis* en humanos y perros de México. Se hicieron pruebas de aglutinación en 203 sueros de humano y 500 de perro. Simultáneamente se realizaron hemocultivos con muestra de los 500 perros. Se encontró que 27 (13.3%) de los sueros de humanos produjeron reacciones positivas con títulos superiores de 1:100. En sueros de perros 140 (28%) fueron positivos y se aisló *Brucella canis* en ocho de ellos. Se produjo el cuadro clínico al infectar artificialmente cinco perros beagle negativos a las pruebas de aglutinación con suero.

Durante los últimos diez años, han aparecido múltiples publicaciones referentes al aislamiento, identificación y control de un microorganismo gram negativo, de forma cocobacilar, el cual es capaz de producir aborto, linfadenitis, epididimitis y atrofia testicular en perros (Spink, 1970). Este agente fue aislado por primera vez en 1966 por Carmichael, a partir de fetos abortados y placentas de beagle de un criadero y posteriormente por diferentes autores (Moore y Bennett 1967; Taul, Powell y Raker, 1967).

Las características de esta bacteria son similares a las que presentan los miembros del género *Brucella*; sin embargo, al igual que *Brucella ovis*, se encuentra siempre en forma rugosa y no posee el antígeno lipopolisacárido, común en las especies lisas que componen este género y el cual es responsable de la capacidad aglutinógena de las mismas.

Estudios referentes al metabolismo de esta bacteria han demostrado que presenta un patrón similar a los biotipos 3 y 4 de *Brucella suis*, excepto que no oxida el eritritol. Se ha propuesto el nombre de *Brucella canis* para identificar a este germen (Carmichael y Bruner 1968; Lois Jones *et al.*, 1967; Díaz, Lois Jones y Wilson, 1968, Moore y Bennet, 1967).

La infección por *Brucella canis* se ha diagnosticado en perros de más de 38 estados de los Estados Unidos (Carmichael y Kenney, 1968), también se ha diagnosticado serológicamente

en perros en el Perú, pero no se ha logrado aislar el germen en ese país (Estelle McWilliams, 1974).

La *Brucella canis* produce también una infección en humanos, caracterizada por: fiebre, dolor de cabeza, linfadenitis, faringitis, dolores musculares, sudoración y esplenomegalia (Swenson, Carmichael y Cundy, 1972). Hasta 1972, en los Estados Unidos se habían identificado 10 casos de infección por *Brucella canis* en humanos (Center for Disease Control, 1974).

En México, existe una elevada población de perros, los cuales mantienen un estrecho contacto entre sí y con los humanos. Este es un factor determinante en la diseminación de enfermedades infecciosas, por lo que se considera de interés el realizar el presente trabajo, que tuvo por objeto el determinar la presencia de *Brucella canis* en infecciones de humanos y perros de este país.

### Material y métodos

*Sueros de humanos.* Se emplearon 203 sueros de humanos. Estos fueron proporcionados por diferentes hospitales y laboratorios clínicos del Distrito Federal, correspondiendo a personas que sufrían de diferentes padecimientos. No fue posible obtener la historia clínica de los pacientes ni tampoco sangre de los mismos para intentar un aislamiento. Todos los sueros fueron empleados para realizar pruebas de aglutinación en placa.

*Muestras de perros.* Se colectaron por duplicado muestras de sangre de 500 perros callejeros. Estos se obtuvieron periódicamente

Recibido para su publicación el 16 de julio de 1975.

Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG, km 15.5 Carretera México-Toluca, México, DF.

en el Centro Antirrábico del DF. Se emplearon para cada perro, 2 tubos Vacutainer<sup>2</sup> estériles, en uno de los cuales se había agregado un medio de cultivo líquido, con 1% de anticoagulante. Este tubo fue empleado para cultivos bacteriológicos. En el otro, se colectó sangre que se dejó coagular con el fin de obtener suero para estudio de aglutinación.

*Técnicas de aglutinación y antígenos empleados.* Las 203 muestras de suero de humano, así como los primeros 300 sueros de perros estudiados, fueron sometidos a la prueba de aglutinación en placa, empleando para ello un antígeno teñido, elaborado con una cepa de *Brucella ovis* (George y Carmichael, 1974). Este antígeno fue proporcionado por Pitman-Moore, Inc., y por el Instituto de Investigaciones en Virología Veterinaria, de la Universidad de Cornell.

Los 200 sueros de perros restantes fueron estudiados mediante pruebas de aglutinación en tubo, empleando un antígeno homólogo, el cual fue elaborado con una cepa de *Brucella canis* aislada durante el desarrollo del experimento. Este antígeno fue producido siguiendo la técnica descrita por Carmichael (1967) y fue estandarizado en relación a una pequeña cantidad de antígeno para tubo proporcionado por el mismo autor, evaluando la sensibilidad de ambos con antisueros negativos y positivos de título conocido. Las pruebas de aglutinación en placa y tubo se efectuaron en base a las técnicas desarrolladas por George y Carmichael (1974) y Carmichael (1967), respectivamente. Se consideraron positivos los sueros que presentaron reacciones de aglutinación completa en las diluciones 1:100 o superiores.

*Examen bacteriológico.* Los tubos Vacutainer destinados a hemocultivos contenían 10 ml de caldo Tripticasa Soya, con 1% de citrato de sodio como anticoagulante. Además se agregó Bacitracina y Polimixina B, en proporción de 25,000 U.I. y 6,000 U.I. por litro y medio, respectivamente. En cada tubo se colectó aproximadamente 1 ml de sangre de cada perro. Los tubos se incubaron durante 9 días a 37°C en atmósfera normal y se hicieron subcultivos cada 3 días en medios sólidos de Agar Tripticasa Soya. La identificación de

<sup>2</sup> Casa Comercial (BBL).

los aislamientos se realizó en base a las propiedades morfológicas, culturales y bioquímicas, características de *Brucella canis* (Carmichael, 1967).

*Infección experimental.* Una suspensión de la primera cepa de *Brucella canis*, aislada durante el desarrollo del experimento, fue inoculada por vía oral y venosa en perros beagles, machos, negativos a las pruebas de aglutinación, con objeto de producir en ellos el cuadro clínico de la enfermedad. En otro perro beagle, hembra, también negativa a las pruebas previas de aglutinación, se practicó una transfusión de 6 ml de sangre de un perro que sufría bacteremia, lo cual se confirmó haciendo hemocultivos inmediatamente después de la transfusión. Estos animales se sangraron periódicamente para determinar niveles de anticuerpos en el suero e intentar el reaislamiento del germen. Se observaron los signos clínicos. En uno de los perros se practicó la orquitectomía bilateral y se hicieron cortes histológicos a partir de testículos y epidídimo.

## Resultados

*Agglutinación con sueros de humano.* Se encontró que 27 de los 203 sueros empleados presentaron reacciones de aglutinación positivas, con títulos de 1:100 y superiores. Esto representa un 13.3% de individuos reactivos positivos.

*Agglutinación con sueros de perro.* En 140 de los 500 sueros sometidos al estudio, se encontró reacción de aglutinación completa en las diluciones 1:100 o superiores, lo que equivale a 28% de animales reactivos positivos. No se encontró diferencia notable entre el número de sueros positivos a la prueba de aglutinación en placa en proporción con el número de positivos a la prueba de tubo, existiendo en ambos casos un porcentaje similar de reactivos.

*Examen bacteriológico.* Se logró el aislamiento e identificación de *Brucella canis* en 8 ocasiones. La primera de ellas fue aislada a partir de un perro callejero. Se observó que en los tubos de medio líquido que resultaron negativos al cultivo, se produjo hemólisis durante las primeras 18-72 hs mientras que en

las muestras de las cuales fue posible el aislamiento del germen, no se produjo hemolisis aun después de 5-6 días de incubación. Los ocho aislamientos se lograron a partir de perros cuyo suero presentó reacciones de aglutinación con títulos de 1:200 y superiores. En ninguno de estos perros existían signos aparentes de la enfermedad.

*Infección experimental.* Después de 15 días de haber aplicado por vía oral y venosa una suspensión de la primera cepa de *Brucella canis* aislada durante el experimento, se encontró que los 4 beagles machos presentaron títulos de aglutinación superior a la dilución 1:200; estos títulos persistieron durante por lo menos los 13 meses que duró la investigación. En todos los casos en que se hicieron hemocultivos de estos animales, fue posible aislar la cepa de exposición, presentándose bacteremia incluso hasta el momento en que se dio por terminado el estudio.

La perra que recibió, por vía venosa, 6 ml de sangre de un perro que presentaba bacteremia, no desarrolló anticuerpos demostrables mediante las pruebas de aglutinación empleadas. Su sangre permaneció negativa al cultivo durante los 13 meses de estudio, a pesar de que convivió durante todo este lapso en la misma perrera con los 4 perros infectados. Inclusive al cruzarse entre ellos, la perra quedó gestante y presentó un parto normal dando a luz a 6 cachorros, los cuales desarrollaron anticuerpos y presentaron bacteremia al cabo de 4 meses de estar en contacto con los perros infectados.

Como resultado de la inoculación de la cepa viva de *Brucella canis*, se presentó en los machos un cuadro clínico caracterizado por: aumento de volumen de los ganglios submaxilares, cuando la vía de infección fue oral; se afectaron los ganglios inguinales cuando se usó la vía venosa. En todos los casos se presentó dermatitis escrotal con descamación de epitelio. La piel del escroto se encontraba hiperémica, había prurito y dolor a la palpación. En dos perros se observó notable aumento de uno de los testículos. Se practicó una orquitectomía bilateral a uno de los perros, y se encontró marcada epididimitis, con hemorragias y adherencias de la túnica. El volumen del epidídimo era considerablemente mayor al del otro testículo que permaneció

normal. En el caso de la hembra, no se produjeron signos clínicos aparentes.

Los estudios histológicos del testículo y epidídimo afectados demostraron lesiones características de epididimitis y orquitis, tales como: infiltración linfocitaria en tejido intersticial con destrucción del parénquima glandular. Se presentó degeneración de los túbulos seminíferos, en los cuales se observaron espermatogonias y linfocitos. El epidídimo presentó gran cantidad de linfocitos y otras células inflamatorias tales como neutrófilos y macrófagos. El otro testículo del mismo perro no presentó lesiones microscópicas, encontrándose también el epidídimo normal.

## Discusión

Es evidente la importancia que representa el estudio de la infección por *Brucella canis* en humanos de México, dado el elevado número de sueros 13.3% que resultaron positivos, con títulos de aglutinación superiores a 1:100. En una investigación similar realizada en Estados Unidos (Center for Disease Control, 1972), se encontró que en 1208 sueros de reclutas militares, solamente el 0.4% fueron positivos a las pruebas de aglutinación. Esta cifra es considerablemente inferior a la encontrada en el presente trabajo; sin embargo, la interpretación de nuestros resultados es difícil, debido a que no fue posible confirmar la infección en humanos reactivos, mediante estudios bacteriológicos que permitieran el aislamiento del germen, existiendo la posibilidad de que algunas de las reacciones de aglutinación pudieran haber sido de carácter inespecífico.

En lo referente a sueros de perros, la frecuencia con que se presentaron reacciones positivas con títulos superiores a 1:100, fue de 28% (140/500 sueros). En estos animales reactivos, la infección por *Brucella canis* se confirmó mediante el aislamiento del germen en 8 de ellos (5.7%), los cuales, aunque no presentaban signos clínicos de la enfermedad sí tenían títulos elevados de anticuerpos en el suero. El escaso número de aislamientos, en relación al número tan elevado de perros con reacciones positivas, puede deberse a que perros que presentan títulos de 1:200 pueden estar en fase de eliminación del germen, por lo que la bacteremia ha desaparecido. Algunos

estudios en este sentido fueron publicados por Moore y Kakuk (1969). quienes encontraron que en 7 de 12 perros infectados desapareció la bacteremia y los títulos de aglutinación bajaron de 1:800 a 1:200, manteniéndose estables en esta dilución. En otros estudios a este respecto (Moore, Gupta y Conner, 1968) los autores encontraron que en un criadero en el cual se había aislado previamente *Brucella canis*, 144 perros con títulos de aglutinación de 1:100 y 1:200 resultaron siempre negativos al aislamiento mediante hemocultivos.

La importancia de estos resultados radica básicamente en el hecho de que existen publicaciones que ponen en evidencia la transmisión del agente etiológico de los perros enfermos a humanos susceptibles (Swenson, Carmichael y Cundy, 1972; Center for Disease Control, 1974). En México, las relaciones entre los perros y sus propietarios son muy estrechas, existiendo, además, una considerable población de perros callejeros que aumenta la posibilidad de diseminación de esta enfermedad.

Los resultados que se obtuvieron al aplicar por vía oral y venosa una suspensión de la primera cepa de *Brucella canis* aislada, coinciden con los cuadros clínicos descritos por otros investigadores (Moore y Kakuk, 1969). Es importante el hecho de que la perra que recibió 6 ml de sangre infectada, por vía venosa, no presentó respuesta serológica ni

manifestaciones clínicas aparentes aun después de convivir 13 meses con los machos infectados, mientras que sus cachorros sí se infectaron por el simple contacto con esos animales. Esto puede deberse a resistencia natural por parte del individuo. Los resultados del análisis histológico de testículo y epidídimo son similares a los encontrados por otros autores en perros infectados por *Brucella canis* (Moore y Kakuk, 1963). Estas observaciones, aunadas a las respuestas serológicas y al cuadro clínico producido por el agente al inocularlo en perros no infectados, confirma que el aislamiento, previamente identificado con base en comportamiento de cultivo y pruebas bioquímicas, correspondió a una cepa patógena de *Brucella canis*.

### Summary

This work, was done in order to ascertain the presence of *Brucella canis* in 203 human and 500 dogs sera in México. Agglutination tests were performed, and simultaneously bacteriological blood cultures were done from the 500 dogs. In the human sera 27 (13.3%) had positive reactions with titers of 1:100 or higher. In the dogs 140 (28.0%) sera were positive to the agglutination test with similar titers. Eight blood cultures were positive to the isolation of *Brucella canis*. The disease was experimentally produced in 4 susceptible dogs.

### Literatura citada

- CARMICHAEL, L.E., 1966, Abortion in 200 Beagles, *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 149, (8): 1126.
- CARMICHAEL, L.E., 1967, Canine Brucellosis: Isolation, Diagnosis, Transmission, *Proceedings H st. Ann. Meeting, US. Livestock San. Ass.*, 517-527.
- CARMICHAEL, L.E. and D.W. BRUNER, 1968, Characteristics of a Newly Recognized Species of *Brucella* Responsible for Infectious Canine Abortions. *Cornell Vet.*, 58 (4): 579-592.
- CARMICHAEL, L.E. and R.M. KENNEY, 1958, Canine Abortion Caused by *Brucella canis*. *J. Am. Vet. Ass.*, 152 (6): 605-616.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1972. Brucellosis Surveillance, *Annual Summary*. 1971, October.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1974, Brucellosis Surveillance, *Annual Summary*, 1972, February.
- DÍAZ, R., LOIS, M. JONES and J.B. WILSON, 1968. Antigenic Relationship of the Gram-negative Organism Causing Canine Abortion to Smooth and Rough *Brucellae*, *J. Bact.*, 95 (2): 618-624.
- ESTELLE MCWILLIAMS, E., 1974, Incidencia de *Brucella canis* en perros del distrito de Chiclayo, Tesis Profesional, *Univ. Nal. Pedro Ruiz Gallo*, Chiclayo, Perú.
- GEORGE, L.W. and L.E. CARMICHAEL, 1974, A plate Agglutination test for the Rapid Diagnosis of Canine Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 35 (7): 905-909.
- LOIS, M. JONES, MARILYN ZANARDI, D. LEONG and J.B. WILSON, 1968, Taxonomic Position in the Genus *Brucella* of the Causative Agent of Canine Abortion, *J. Bact.* 95 (2): 625-630.

- MOORE, J.A., B.N. GUPTA and G.H. CONNER, 1968, Eradication of *Brucella canis* Infection from a Dog Colony, *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 153 (5) : 523-527.
- MOORE, J.A. and MARIAN BENNETT, 1967, A Previously Undescribed Organism Associated with Canine Abortion, *Vet. Rec.*, 80 (20): 604-605.
- MOORE, J.A. and T.J. KAKUK, 1969, Male Dogs Naturally Infected with *Brucella canis*, *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 155 (8): 1352-1358.
- SPINK W.W., 1970, Comments on Canine Brucellosis Due to *Brucella canis*, *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 156 (12): 1734-1736.
- SWENSON, R.M., L.E. CARMICHAEL and K.R. CUNDY, 1972, Human Infection with *Brucella canis*, *Ann. Int. Med.*, 76 (3) : 435-438.
- TAUL, L.K., H.S. POWELL and O.E. BAKER, 1967, Canine Abortion Due to An Unclassified Gram-Negative Bacterium, *Vet. Med. Small Animal Clinician*, 543-544.