

SEGUIMIENTO DE UN BROTE DE *Brucella canis* EN UN CRIADERO DE PERROS EN LA CIUDAD DE MEXICO^a

Graciela Méndez Nárez^b

Eduardo Mota Cortés^b

Beatriz Arellano Reynoso^c

Juan Ignacio Monroy Basilio^{bc}

Efrén Díaz Aparicio^c

RESUMEN

Méndez NG, Mota CE, Arellano RB, Monroy BJI, Díaz AE. *Téc Pecu Méx.* 1999;37(3)43-50. En un criadero de perros Schnauzer miniatura se presentaron diez abortos en mayo de 1997; una de estas perras que había abortado entre los 40 a 45 días de gestación, se llevó al laboratorio de diagnóstico. Los resultados serológicos fueron positivos a *B. canis* y negativos a *Leptospira spp.* A los animales del pie de cría se les realizó una inspección clínica; un estudio serológico con las pruebas de tarjeta y 2-mercaptoetanol; un estudio bacteriológico de cuatro fetos abortados y de secreción vaginal; y extracción de ADN de los pulmones e hígados fetales para realizarles la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En la palpación de los testículos y epidídimos de siete perros, tres resultaron con alteraciones (42.8%). En el estudio serológico, de 33 animales se encontraron 15 positivos (45.4%) a *B. canis* (tres machos y doce hembras maduros sexualmente). En el estudio bacteriológico de los fetos abortados, se obtuvieron dos aislamientos de *B. canis* a partir de pulmón fetal, los cuales también fueron positivos con la técnica de PCR. Se determinó que el brote de abortos de este criadero de perros fue causado por *B. canis*, el cual se originó por el ingreso al criadero de un semental alquilado, seropositivo a *B. canis*.

PALABRAS CLAVE: *Brucella canis*, Perros, Abortos, Diagnóstico, PCR.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso subagudo o crónico, causada por diversas especies del género *Brucella* y que afecta a animales domésticos, silvestres y al ser humano. Las especies del género *Brucella*, se clasifican como lisas o rugosas; las de tipo liso comprenden a *Brucella abortus*,

B. melitensis, *B. suis* y *B. neotomae* y las rugosas son *B. ovis* y *B. canis*. Las brucelas del tipo rugoso carecen de la cadena "O" del lipopolisacárido de membrana externa (1).

La brucelosis canina es principalmente producida por *B. canis* que es una bacteria gram negativa, de morfología cocobacilar, inmóvil, carece de cápsula, espora y flagelos. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, es fuerte productora de ureasa, no produce H₂S, débil productora de oxidasa y produce aglutinación con acriflavina. La *B. canis* fue aislada por primera vez en 1966 por Carmichael, a partir de abortos y partos fallidos, en un criadero de perros

a Recibido el 20 de mayo de 1999 y aceptado para su publicación el 23 de febrero de 2000.

b Laboratorio de Análisis Clínicos Veterinarios.

c CENID Microbiología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural.

Correspondencia: Efrén Díaz Aparicio. CENID Microbiología Veterinaria. INIFAP-SAGAR. Apartado Postal 41-682, México, 11001, DF.

raza Beagle en los Estados Unidos de América (2).

El ser humano es relativamente resistente a la infección por *B. canis*, sin embargo, se puede contagiar accidentalmente en el laboratorio o teniendo contacto con animales infectados (3).

Cuando *B. canis* penetra en el perro, se presenta una bacteremia prolongada, diseminándose por todo el organismo y alojándose principalmente en los nódulos linfáticos, bazo, hígado, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, vesículas seminales y médula ósea (4).

En el perro, los signos de la enfermedad pueden ser inaparentes; cuando se hacen presentes, en el macho la infección crónica se caracteriza por presentar orquitis, epididimitis y atrofia testicular (4). En ambos sexos hay lesiones en articulaciones, inflamación de los nódulos linfáticos, retrofaríngeos e inguinales, pudiendo llegar a producir infertilidad en etapas reproductivas. En la perra, se presenta el aborto a los 40-45 días de gestación, no habiendo respuesta febril. La bacteria es eliminada durante el aborto, pudiéndose encontrar una gran cantidad de microorganismos en el feto, así como en subsecuentes descargas vaginales, persistiendo de cuatro a seis semanas después del aborto. En los machos infectados la orina y el semen son fuentes de contagio, alojándose el agente en las vías genitales y excretándose en forma intermitente (1,4,5).

El diagnóstico serológico de *B. canis* en perros, se realiza utilizando antígenos de células completas o subcelulares; existen

varias pruebas las cuales varían en sus valores de sensibilidad y de especificidad; las pruebas más usadas son las de rosa de Bengala y 2-mercaptoetanol, y aunque las pruebas de fijación del complemento y ELISA presentan mayor sensibilidad y especificidad, no está estandarizado su uso en México. El diagnóstico bacteriológico se lleva a cabo a partir de muestras de sangre, secreciones vaginales, útero, semen y testículos; de los fetos abortados, se prefiere pulmón, hígado y líquido estomacal (6,7).

Actualmente existen herramientas diagnósticas de biología molecular como lo es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite la identificación de un fragmento del genoma bacteriano por medio de la generación de múltiples copias del mismo. Este fragmento de ADN se puede visualizar posteriormente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, bajo una fuente de luz ultravioleta. La técnica de PCR es muy sensible y además de ser más rápida que la bacteriología, es menos riesgosa para el laboratorista que trabaja con muestras contaminadas, ya que éstas pueden ser inactivadas con calor u otros desinfectantes, como el fenol, antes de iniciar la labor diagnóstica (8).

El objetivo de este trabajo fue seguir el desarrollo de un brote de brucelosis en un criadero de perros, utilizando para ello estudios serológicos, bacteriológicos y de biología molecular.

El criadero de perros en estudio, se encuentra localizado en la zona centro del Distrito Federal, tenía un total de 33 animales, 26 hembras de uno a seis años

de edad y 7 machos de uno a siete años de edad, de la raza Schnauzer miniatura.

En el criadero no se tenían antecedentes de serología positiva a *B. canis* ni de presencia de abortos. De enero a mayo de 1997, se presentaron diez abortos durante el último tercio de la gestación. Como antecedente, antes de que empezaran los problemas se había realizado la monta, utilizando un perro de la raza Schnauzer miniatura, que no era de la jauría, y el cual había sido alquilado al criadero. En mayo de 1997, fue llevada a un laboratorio privado de diagnóstico veterinario, una perra, raza Schnauzer miniatura, de tres años de edad, a fin de efectuarle las pruebas serológicas de tarjeta y 2-mercaptoetanol para el diagnóstico de brucelosis y de microaglutinación para leptospirosis; la historia clínica refería que 15 días antes de la fecha del diagnóstico, había abortado entre los 40 a 45 días de gestación. Los resultados serológicos obtenidos fueron positivos a *B. canis* y negativos a leptospirosis.

Se realizó un examen clínico y un muestreo de suero sanguíneo y tejidos, de los demás animales del criadero para diagnosticar brucelosis en ellos. Observación y palpación de los testículos de siete perros, considerando su consistencia, la simetría testicular y el tamaño del epidídimo. Se obtuvo suero sanguíneo de 33 animales, y se mantuvo a -20°C hasta su evaluación. Haciendo un lavado previo del prepucio con agua y jabón, se obtuvo por masturbación semen de siete perros, colectándose en bolsas estériles de plástico y manteniéndolas en refrigeración a 4°C , hasta realizar la inoculación en los medios de cultivo, en un lapso no mayor de 4 h.

De las diez hembras que habían abortado, se obtuvieron con hisopos estériles muestras de secreciones vaginales, que se colocaron en medio de transporte de Stuart y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta realizar la inoculación en los medios de cultivo. De una perra seropositiva, cruzada con un macho seropositivo, se pudieron obtener cuatro fetos que se mantuvieron en congelación a -20°C , para posteriormente realizar los cultivos bacteriológicos y la extracción de ADN por la técnica de fenol-CTAB (9).

La prueba de tarjeta se realizó en placas de plástico, depositando 0.03 ml del antígeno y 0.03 ml del suero problema, homogenizando la mezcla y agitando lentamente durante 4 min. La lectura se realizó en un transluminador, considerando reacción positiva la presencia de aglutinación (10).

Para la prueba de 2-mercaptoetanol, se hicieron diluciones dobles de los sueros problema y se mezclaron con la solución del 2-mercaptoetanol, se agregaron 0.03 ml del antígeno de *B. canis*; las diluciones trabajadas fueron: 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200. Se incubaron a 37°C durante 24 h para después realizar la lectura, con el criterio de dar como reacción positiva la presencia de aglutinación a títulos de 1:25 o mayores (10).

Para ambas pruebas se utilizó un antígeno de células completas de *B. canis* en solución amortiguadora de carbonato - bicarbonato y rosa de Bengala a un pH de 8.9 (10).

Las muestras de los órganos fetales: pulmón e hígado, se maceraron con

solución salina, y aunadas a las muestras de semen, secreciones vaginales y líquido estomacal, por medio de hisopos se inocularon por duplicado en los medios de agar sangre y agar chocolate, incubando a 37°C, en atmósfera normal durante ocho días (6).

Para la identificación de las colonias sospechosas de *B. canis*, se realizaron frotis y tinción de Gram, y reacciones a la urea, triple azúcar hierro, oxidasa, catalasa y aglutinación con acriflavina (6).

Se procedió a la extracción del ADN de las cepas aisladas e identificadas como *Brucella*, para su posterior estudio por la técnica de PCR (9). El ADN extraído de los pulmones e hígados de los cuatro fetos abortados, también fue trabajado con la técnica de PCR.

Se realizó un PCR anidado con iniciadores que forman parte del gen *omp2* de *Brucella abortus*, este gen codifica para una porina de 36 kilodaltones (Kda), el cual fue secuenciado en *B. abortus*, pero presenta una gran homología con otras especies de *Brucella* (11). El primer protocolo incluye

una reacción de PCR con un juego de tres iniciadores (PCR 1); estos permiten la amplificación de un fragmento de ADN del genoma de la bacteria, de 440 pares de bases (pb) en el caso de *B. canis* (11). El segundo protocolo se realizó con dos iniciadores (PCR 2), para el cual se tomó 1 ml a partir de la reacción de PCR 1, como fuente de ADN blanco. Esta segunda reacción aumenta la sensibilidad de la prueba y permite la amplificación de un fragmento de 193 pb (12) (Cuadro 1).

La reacción 1 (PCR 1) se realizó en un volumen final de 50 ml con los siguientes reactivos: solución amortiguadora de PCR, 1.0 milimolares (mM) de Tris-Cl, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, pH 8.3, 100 micromolares (μM) de cada deoxinucleótido (dNTP) (Boheringer Mannheim), 200 nanomolares (nM) de cada iniciador; 2 unidades (U) de la bacteria termófila *Thermus acuaticus* (Taq) polimerasa (Biotecnologías Universitarias, UNAM, México), 200 nanogramos (ng) de ADN; se cuantificó la cantidad obtenida en ng/μl de cada muestra en un fluorómetro, siguiendo las instrucciones del fabricante (DyNA Quant 200, Hoefler) con dos

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores usados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, utilizada en el diagnóstico de *Brucella canis*.

PCR 1	a)	5'-GTTATCTCGCCTTTACCG -3'
	b)	5'-CTCGGATCGTAAAGGCT-3'
	c)	5'-ATCGTGTAATCGTTGTCAAC-3
PCR 2	d)	5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3'
	e)	5'-CCAGCCATTGCGGTCCGGTA-3'

repeticiones por muestra y obteniendo el promedio y 40 μ l de aceite mineral estéril.

El programa en el termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller, M. J. Research, Inc) fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 32 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; y una extensión final a 72°C por 15 min.

La reacción 2 (PCR anidado) se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l con los siguientes reactivos: solución amortiguadora de PCR, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-Cl pH 9.0, 0.1% Tritón X-100; 1.5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 150 nM de cada iniciador, 2.0 U de Taq polimerasa; 1 μ l de ADN de la muestra del PCR 1, el cual sirvió como blanco del segundo juego de iniciadores y 40 μ l de aceite mineral estéril. El programa en el termociclador fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 60 seg, 60°C por 60 seg y 72°C por 60 seg, y una extensión final a 72°C por 3 min.

Se evaluó la calidad del producto amplificado por electroforesis en un gel de agarosa 1% (peso/ vol. en TBE 0.5 x). Se consideró como reacción positiva aquella que presentó bandas de 440 pb en el gel de agarosa, después del primer PCR; y una banda de 193 pb, posterior al segundo PCR o anidado, comparándolas con el marcador de peso molecular, fago I cortado con HindIII (Sigma, US).

En el examen clínico, tres perros (42.8%) de los siete evaluados presentaron aumento de tamaño de testículos y epidídimo, así

como asimetría unilateral; estos animales eran seropositivos y tenían una edad entre dos a siete años.

Con las pruebas de tarjeta y 2-mercaptoetanol, de un total de 33 sueros, 15 dieron positivos a ambas pruebas, a (45.4%); los títulos de estos sueros a la prueba de 2-mercaptoetanol, fueron de 1:50 a 1:200. De estos positivos, resultaron tres machos y doce hembras, con edades desde los seis meses hasta los siete años.

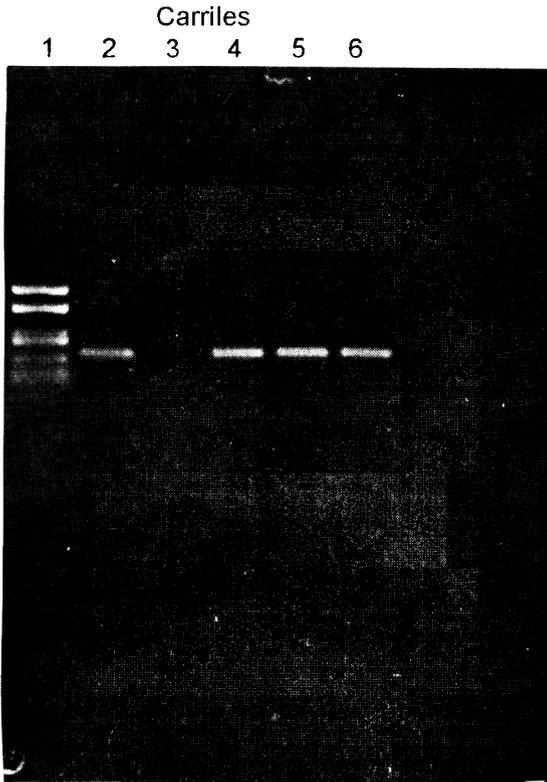
A partir de las muestras de pulmón fetal, se obtuvieron dos aislamientos, que posteriormente se identificaron como *B. canis*. De las demás muestras fetales, de exudado vaginal y de semen no se logró aislar *B. canis*.

Al trabajar el ADN de hígado y pulmón de los cuatro fetos, la técnica de PCR mostró como positivos a dos fetos a partir de las muestras de pulmón, mismas que fueron positivas al aislamiento bacteriológico (Figura 1)

En los perros del criadero el porcentaje de reactores positivos a la serología, fue del 45.4%. Varios autores han realizado seroprevalencias de *B. canis* en México, con los siguientes porcentajes: 28.0, 11.2, 17.4, 18.0 y 45.4% (13,14,15,16,17).

Existen muy pocos estudios en México, sobre seroprevalencias de *B. canis* en criaderos; uno de ellos con una muestra de 68 perros procedentes de varios criaderos de la ciudad de México, notifica un 8.9% de positivos, cifra que refleja la presencia de esta enfermedad en perros de cría (14); otro estudio en criaderos del valle de Toluca en el Estado

Figura 1.- PCR anidado para el diagnóstico de *Brucella canis*



- 1.- Marcador, plásmido pUC 18
- 2.- Testigo (+), ADN de *B. canis*
- 3.- Testigo (-), sin ADN
- 4.- Pulmón feto 1, positivo a *B. canis*
- 5.- Pulmón feto 2, positivo a *B. canis*
- 6.- ADN de *B. canis*, cepa aislada del pulmón del feto.

de México, que encontró una muy baja prevalencia de brucelosis (18).

A diferencia de los trabajos antes mencionados, éste se realizó en una población con un brote de la enfermedad y dando seguimiento a un caso, y no como un estudio de prevalencia.

El foco de contagio en el criadero fue el perro introducido y utilizado como

semental, ya que se cruzó con una hembra que se volvió seropositiva y presentó aborto. Después, ella fue cruzada con los sementales del criadero, además de que probablemente diseminó la brucelosis al momento del aborto, ya que a partir de esto se presentó el brote de la enfermedad.

Los machos seropositivos y que presentaban orquitis y epididimitis clínica, tenían entre tres y siete años, en cambio, de los negativos, dos eran menores de un año y dos mayores de un año, que no habían tenido contacto con las hembras y machos seropositivos. La principal vía de contagio es la venérea y por tanto afecta principalmente a los animales sexualmente activos, aunque no se descartan otras posibles vías de contagio (3).

Las hembras seropositivas y las que presentaron aborto, eran de una edad comprendida entre un año y medio a cuatro años y del total de hembras de ese rango de edad 91.6% fueron seropositivas. En las hembras menores de un año y medio, sólo una fue seropositiva. Por lo tanto las hembras que estaban en edad de gestar, presentaban una elevada posibilidad de enfermar, por vía venérea o por secreciones de las parturientas con las que estaban en contacto. La función reproductiva es por tanto un factor de riesgo en el contagio de la enfermedad y la vía sexual parece ser la principal vía de infección (3).

Los aislamientos obtenidos a partir de pulmón fetal, están de acuerdo con lo mencionado en la literatura (2,6), sobre

los tejidos a partir de los cuales aislar *B. canis*. Estos aislamientos demuestran que los abortos deben ser atribuidos a *B. canis*.

Al trabajar con el ADN de las dos cepas de *B. canis*, aisladas e identificadas mediante bacteriología, la técnica de PCR fue un instrumento útil en su identificación; en el diagnóstico realizado a partir de las muestras de los fetos, el PCR dio resultados iguales a la bacteriología, pero debido al pequeño número de muestras trabajadas no se puede establecer una comparación bien sustentada. La técnica de PCR, presenta como ventajas sobre la bacteriología, su sensibilidad y que no requiere que las bacterias existentes en la muestra estén viables para poder ser detectadas (9).

Es de destacar que el semental que fue el causante de la introducción de la enfermedad en el criadero, fue alquilado por un Médico Veterinario, lo que refleja el desconocimiento de la brucelosis canina, a pesar de que es un padecimiento que se notificó en México desde 1975 (13).

No se realizaron estudios diagnósticos de brucelosis, en las personas que trabajaban en el criadero, ni en personas que estuviesen relacionadas con los perros involucrados en el brote, ya que aunque la *B. canis* es patógena para el ser humano, su virulencia es reducida (2). En este caso, la gran cantidad de bacterias que son eliminadas al momento del aborto por el canal vaginal (3), hacen probable que se presentara la infección en las personas, sin embargo, no existieron facilidades para la toma de muestras.

AN OUTBREAK OF *Brucella Canis* IN A DOG BREEDING UNIT IN MEXICO CITY

ABSTRACT

Méndez NG, Mota CE, Arellano RB, Monroy BJI, Díaz AE. *Téc Pecu Méx.* 1999;37(3)43-50. In May 1997, a breeding unit for miniature Schnauzers suffered ten abortions. One of the bitches which had aborted between days 40 and 45 of gestation was brought to our diagnostic laboratory for testing for brucellosis and leptospirosis. The results were positive for *B. canis* and negative for *Leptospira* spp. For this reason a study of breeding animals was carried out, including physical examination and serum samples collected for the diagnostic card and 2 mercaptoethanol tests. Collection of blood, vaginal secretions and four aborted fetuses for bacteriological testing was also made. In order to determine the genus and species of the causal agent, biochemical and Polimerase chain reaction (PCR) tests using specific primers for genus *Brucella* were made. Physical inspection of the testes and epididimus of seven dogs (two to seven years old) showed three (43%) to have morphological changes. In serological tests, of the 33 dogs tested, 15 tested positive (45%) of which three were males, and 12 females. The ages of these animals ranged from six months to seven years. In bacteriological tests, two samples tested as positive from fetal lungs, which also tested positive to the PCR test. These two fetuses came from seropositive females. It was concluded that from the serological, bacteriological and PCR tests, *B. canis* had caused the outbreak of abortions in this breeding unit.

KEYWORDS: *Brucella canis*, Canine, Abortions, Diagnosis, PCR.

LITERATURA CITADA

1. Moriyón UI. *Brucella* cell structure. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago ILL, US. 1997;3-18.
2. Carmichael LE. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal brucellosis*. Boca Ratón; US: Press Inc; 1990;335-350.

3. Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet* 1988;(87):69-97.
4. Carmichael LE, Kenney RM. Canine brucellosis, the clinical disease. Pathogenesis and immune response. *J Am Vet Med Assoc* 1970;(156):1726-1734.
5. Johnson CH. Desórdenes de la gestación. *Rev Vet AMMVEPE*. 1990;(3):9-10.
6. Vázquez NJ. Utilización de un antígeno de *Brucella canis* teñido con rosa de Bengala, para diagnosticar la brucelosis canina [resumen]. XXII Congreso nacional de microbiología. Acapulco, Mex. 1991:56.
7. Alton GG, Jones LM, Agnus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique; París, 1988:34-71.
8. Randall K. Saiki. The design and optimization of the PCR In: Erlich HA editor. PCR technology, principles and applications for DNA amplification. First ed. New York, US: Stockton Press;1989.
9. Arellano RB. Comparación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y bacteriología para el diagnóstico de *Brucella melitensis* en caprinos vacunados e infectados [tesis maestría]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.
10. Vázquez NJ. Diagnóstico de *Brucella canis* En: Díaz AE, Hernández AL, Valero EG, Arellano RB editores. Diagnóstico de brucelosis animal. México, DF: INIFAP, IICA. OPS; 2000.
11. Ficht TA, Husseinen HS, Derr J, Bearden SW. Species -specific sequences at the omp2 Locus of *Brucella* type strains. *International J of Syst Bacteriol* 1996;46:(1), 329-331.
12. Leal KDS, Martínez VIO, López MA, Martínez SJP. Single-Step PCR for detection of *Brucella* spp from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol* 1995;33(12):3087-3090.
13. Flores CR. Estudio sobre la presencia de *Brucella canis* en México. [resumen] XII reunión anual. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG, México 1995:45.
14. González VL. Estudio sobre la presencia de *Brucella canis* en criaderos nacionales [tesis licenciatura]. Cuautitlán, Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1983.
15. Gutiérrez HR. Contribución al estudio sobre *Brucella canis* en perros nacionales y en perros introducidos al país por la aduana del aeropuerto internacional de la ciudad de México [tesis licenciatura]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1983.
16. Nava VM. Frecuencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en perros sacrificados en el antirrábico del municipio de Naucalpan de Juárez durante marzo-agosto de 1992 [tesis licenciatura]. Toluca, Estado de México: Universidad Autónoma del Estado de México; 1993.
17. Alonso ML, Flores CR. Presencia de *Brucella canis* en perros de Monterrey [resumen]. Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México, 1995:82.
18. Millán ML. Detección serológica de *Brucella canis* en perros pertenecientes a criaderos del valle de Toluca y municipios circunvecinos [tesis licenciatura]. Toluca, Estado de México: Universidad Autónoma del Estado de México; 1999.