

ENCUESTA EXPLORATORIA DE INFECCIÓN POR *Brucella canis* EN PERROS DE VILLAVICENCIO - COLOMBIA

EXPLORATORY SURVEY OF *BRUCELLA CANIS* INFECTION IN DOGS FROM VILLAVICENCIO - COLOMBIA

Ana Pardo D¹, MVZ, Carlos Pérez A¹, MVZ, Agustín Góngora O^{2*}, Dr. Sci, Luz
Gómez L³, Bacterióloga; Alexander Moreno V³, MVZ

¹Ejercicio particular. ²Universidad de los Llanos, Escuela de Ciencias Animales, Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal – GIRGA. Villavicencio, Colombia.
³Universidad de los Llanos, Escuela de Ciencias Animales. *Correspondencia: agongora@unillanos.edu.co

Recibido: Marzo 25 de 2009; Aceptado: Julio 15 de 2009

RESUMEN

Objetivo. Determinar la presencia de anticuerpos a *B. canis* en perros domésticos y callejeros del municipio de Villavicencio, Colombia. **Materiales y métodos.** Se utilizó la prueba de aglutinación rápida en placa con antígeno menos mucoide (M-) en 201 muestras de suero. En dos animales seropositivos se realizó intento de aislamiento por hemocultivo en medio selectivo para *Brucella* (oxoid®). En un animal seropositivo, con crecimiento bacteriano con características morfológicas sugestivas a *B. canis* se realizó histopatología de testículo, bazo e hígado. **Resultados.** La seropositividad general fue de 1.49% y correspondió a tres caninos machos, dos de los cuales presentaron signos clínicos de epididimitis y orquitis (unilateral). El cultivo y la histopatología no fueron concluyentes para el diagnóstico de *B. canis*. **Conclusiones.** La seropositividad fue baja y sugiere que la población estudiada no ha estado en contacto con la bacteria. La presencia de reactores puede estar asociado con falsos positivos. El no aislamiento de la bacteria no indica que la enfermedad no exista por lo que se requiere de nuevos estudios.

Palabras clave: Brucelosis, *Brucella canis*, serodiagnóstico, Colombia.

ABSTRACT

Objective. To establish the presence of *B. canis* antibodies in domestic and street dogs in Villavicencio, Meta, Colombia. **Materials and methods.** 201 dog sera samples were analyzed by rapid plate agglutination test with mucoid (M-) antigen. Isolation by haemoculture in brucella selective medium (Oxoid®) was attempted in two seropositive animals. Histopathology of the testicle, spleen and liver were carried out on a seropositive animal having bacterial growth with morphological characteristics suggestive of *B. canis*. **Results.** General seropositivity was 1.49% and corresponded to three male dogs, two of them presented clinical signs of unilateral epididymitis and orchitis. Culture and histopathology were unable to diagnosis *B. canis*. **Conclusions.** Seropositivity was low and suggested that the population being studied had not been in contact with the bacteria. The presence of reactors could have been associated with false positives. The failure to isolate bacteria did not indicate that the disease does not exist, therefore, new studies are needed.

Key words: Brucellosis, *Brucella canis*, serodiagnosis, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis canina es una enfermedad de carácter zoonótico de presentación clínica o subclínica que ocasiona aborto en las hembras caninas especialmente entre los 45-55 días de la gestación. En los machos, las lesiones características corresponden a dermatitis escrotal, epididimitis, orquitis uni o bilateral, discospondilitis y degeneración testicular (1). La transmisión de la bacteria es esencialmente venérea, aunque pueden existir otras vías de infección por estrecho contacto con animales infectados (2).

Los caninos se pueden infectar por cuatro de las seis especies de *Brucella* que hasta hace poco se habían identificado (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella canis*), aunque no se han comprobado las infecciones por *Brucella ovis* y *Brucella neotomae* (2). Recientemente, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotes, subcomité de taxonomía de *Brucella* incluyó tres nuevas especies, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis* y *Brucella nicroti* (3) que por ser recientemente descubiertas, no se tiene mayor información.

Las fuentes de infección de la *B. canis* para el humano son el contacto con fetos abortados y las secreciones vaginales o prepuciales, aunque el cuadro clínico es de

menor gravedad que el ocasionado por las otras especies de *Brucella* (2). En los países en donde la prevalencia de la brucelosis es alta, la transmisión al humano ocurre con menor frecuencia (4).

El diagnóstico definitivo de *B. canis* en los humanos y los caninos es el cultivo, sin embargo, es difícil de realizar ya que la bacteria se elimina intermitentemente y no siempre se obtienen resultados (4), por tal razón se utilizan las pruebas serológicas, siendo una de las más utilizadas la aglutinación rápida en placa con o sin adición de 2 mercaptoetanol que utiliza una cepa menos mucóide (M-) de *B. canis* que reduce el número de reacciones cruzadas (5).

La brucelosis canina se ha convertido en un serio problema de salud pública en diversos países y ciudades del mundo, por la alta población de animales abandonados, los cuales conforman colonias y deambulan libremente sin control sanitario. La enfermedad se ha reportado en Canadá (6), Sur de los Estados Unidos (7), México (8), España (9) Alemania (10), Polonia (11), República Checa (12) e Italia (13). Igualmente, en Asia como en la India (14), Filipinas (15), Corea (16), China (17), Japón (18), Turquía (19), Malasia (20), Taiwan (21)

y Nigeria (22). En Suramérica, Brasil (23), Argentina (24) y Chile (25).

En Colombia la Brucelosis canina era desconocida, aunque se había reportado evidencia serológica (26,27) no se había aislado la bacteria como una prueba definitiva de la existencia en el país. En Argentina en el 2005, se reportó el primer aislamiento en un criadero comercial en animales importados de los Estados Unidos, el cual fue tipificado por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos Malbrán Buenos Aires Argentina (28).

Con el antecedente descrito, surgió la necesidad de conocer la posible existencia de la enfermedad en otras ciudades, diferentes al lugar en donde se reportó por primera vez, dada la permanente movilización de animales por el país. Actualmente, la industria canina viene en constante crecimiento favorecido por los altos precios que alcanzan algunas razas especialmente aquellas utilizadas como animales de compañía o guardianes. En Villavicencio al igual que en otras ciudades, se realizan eventos feriales que reúnen un alto número de animales, en donde se convienen cruzamientos, sin que medien restricciones sanitarias frente a esta enfermedad.

El objetivo de este estudio fue determinar la reactividad serológica a *B. canis* en perros domésticos y callejeros de Villavicencio e intentar en los animales seropositivos el aislamiento de la bacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y obtención de muestras. Se tomaron muestras de sangre (n:201) caninos de una población total aproximada de 40.000 animales (Comunicación personal Secretaría de Salud Municipal de Villavicencio), 101 muestras correspondieron a animales de compañía que habían sido remitidos a consultorios particulares y que al examen clínico habían presentado por lo menos un signo clínico compatible con brucelosis canina. Las

otras 100 muestras correspondieron a animales recogidos de la ciudad y trasladados a un albergue municipal. Ambos grupos fueron sometidos a un examen clínico y se obtuvo información sobre edad y sexo.

De cada animal se obtuvo aproximadamente 5.0 ml de sangre por punción yugular en tubos estériles al vacío sin anticoagulante (vacutainer®). Después de una hora de su obtención se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos y el suero extraído fue fraccionado en alícuotas de 1.0 ml. Los sueros permanecieron congelados a -70°C hasta su uso.

Prueba de aglutinación rápida con antígeno (M-). Se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, siguiendo la técnica descrita por Carmichael y Joubert (6). Brevemente, en una lámina de vidrio se colocaron 25 mL de la muestra problema en el centro de la cuadrícula, se adicionaron 25 mL de una solución de 2-mercaptoetanol, luego se agregaron 50 mL de antígeno para prueba de aglutinación rápida en placa (PARP) convenientemente homogeneizado y a temperatura ambiente. Se homogenizó en forma individual cada muestra con un palillo de madera cambiando cada vez y en forma giratoria la placa. Se colocó la placa en un aglutinoscopio y después de 2 minutos se realizó la lectura. El criterio para un diagnóstico positivo fue la aparición de aglutinación (presencia de grumos), en caso contrario se consideró negativa.

Cultivo. Se realizaron 3 cultivos seriados con intervalo de una semana en los animales seropositivos a partir de sangre periférica, la cual fue inoculada en medio selectivo para Brucella suplementado con suero equino al 10% (Oxoid®). Se observó el crecimiento de colonias por 8 días, tiempo del cual, la no presencia fue considerado como negativo.

Histopatología. Se realizó eutanasia

(Eutanex®) en un animal seropositivo por la prueba de aglutinación con antígeno M- el cual a la vez se había obtenido un cultivo sospechoso a *B. canis*. Se tomaron muestras de riñón, testículo, e hígado que fueron fijadas en formalina buferada al 10%.

RESULTADOS

La reactividad serológica general fue de 1.49% a la prueba de aglutinación con antígeno M- y correspondió a tres caninos, uno de raza bóxer de cuatro años de edad, otro de raza Beagle de 5 años y otro de raza criolla de 3 años, éste animal se clasificó en la categoría de callejero. La reactividad serológica en los perros domésticos fue de 1.98% (2/101) y 1% (1/100) en los callejeros.

En el canino de la raza Beagle se obtuvo después de un segundo hemocultivo el crecimiento de colonias con características morfológicas sospechosas a *Brucella*. Se realizó coloración de Gram y pruebas bioquímicas a la cepa aislada teniendo como control positivo una cepa de *Brucella canis* M- como referencia. La cepa aislada correspondió a bacilos Gram negativos mientras la cepa de referencia a coccobacilos Gram negativos. Igualmente se observaron diferencias en las pruebas de urea y catalasa, siendo urea negativa y catalasa débilmente positiva, mientras la cepa de referencia fue urea positiva en menos de 1 min y catalasa negativa.

Después de un repique en agar Mc Conkey se observó abundante crecimiento con presencia de colonias compatibles con bacilos Gram negativos no fermentadores, mientras de la cepa de referencia se obtuvo escaso crecimiento.

Los resultados histopatológicos revelaron a nivel de bazo moderados a severos cambios depléticos de áreas T y B, con marcada infiltración plasmocitaria. En riñón se observó focos de nefritis intersticial linfoplasmocitaria en el área cortical y medular, en hígado hepatitis portal y periportal con infiltrado linfoplasmocitario

y dilatación de sinusoides. En testículo no se observaron lesiones microscópicas.

DISCUSIÓN

La seropositividad de anticuerpos a *B. canis* (1.49%) obtenido en este estudio es baja y menor (3.2%) a la obtenida por Ulloa y Hernández (26) en perros de la ciudad de Bogotá en 1978. En contraste existió un mayor número de reactores en Medellín en un estudio en 157 animales, de los cuales 27 (17.20%) fueron seropositivos, en 4 animales se aislaron bacterias Gram negativas con patrón bioquímico presuntivo con *B. canis*, que fueron posteriormente tipificadas en un laboratorio de referencia (28).

La alta seropositividad en este estudio, fue explicada por la procedencia de los animales de un criadero comercial, en donde existía una alta interacción entre la población y por tanto, un importante factor de riesgo para adquirir la infección. Simultáneamente a este estudio, se reportó en Colombia el primer caso de transmisión de *Brucella canis* a un humano que no presentaba sintomatología clínica, pero que mantenía estrecho contacto con los animales infectados. Este aislamiento fue tipificado por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) Dr. Carlos Malbrán Buenos Aires Argentina (28).

Aunque en este estudio se aisló una bacteria morfológicamente compatible con *Brucella*, en uno de los animales seropositivos, la morfología y patrón bioquímico no fueron consistentes con *Brucella canis*, hecho que se ve apoyado por los hallazgos histopatológicos.

Es posible que la reactividad serológica en tres de los animales encuestados pueda ser el resultado de falsos positivos, debido a reacciones cruzadas con cepas mucoides de *Pseudomonas*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (1). La no obtención del aislamiento, no indica que la bacteria no estuviera presente, lo cual sugiere nuevos estudios en animales seropositivos.

En la actualidad, no se han realizado estudios en otras ciudades de Colombia, los cuales permitan conocer la situación real de esta enfermedad. Contrastan los limitados trabajos en el país, con los provenientes de otros lugares, en donde las prevalencias encontradas varían entre bajas a moderadamente altas, por ejemplo en Estados Unidos en Alabama 77.4%, Nashville 18.7%, Memphis 10% y Georgia 9% (29). En Brasil en Río de Janeiro 29.4% y Niterói 19.2% (30). En animales callejeros la tasa de seroreactores fue baja, en ciudades como Detroit 6.6%, Illinois y Wisconsin 6.7%, Georgia 8% (31-33). En la India se reportan valores similares a los encontrados en este estudio 2.18% (34) y 2% (35) respectivamente.

En conclusión, la seropositividad a *Brucella canis* en perros del municipio de Villavicencio es baja, lo cual sugiere que la población muestreada no ha estado expuesta a esta infección bacteriana y por el momento no representa amenaza para el resto de la población animal, ni para los humanos. Sin

embargo, este hallazgo no impide que se preste una mayor vigilancia en los consultorios particulares y clínicas universitarias para detectar oportunamente la presencia de esta nueva enfermedad, situación que debe hacerse extensiva para todo el país. La implementación de nuevas pruebas diagnósticas contribuiría a dilucidar la situación actual, en especial a lo referente a casos humanos con serología negativa para *B. abortus* pero que presentan sintomatología con brucelosis. Igualmente se requiere actualizar nuestra legislación sanitaria frente a la importación de animales de países en donde la enfermedad es prevalente.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana por la financiación de este proyecto. Doctora Martha Olivera Ángel del Grupo de Fisiología y Biotecnología de la Universidad de Antioquia por el diagnóstico serológico.

REFERENCIAS

1. Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao DP, Megid J, Salgado VR, Richtzenhain LJ. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology* 2007; 67: 1203–1210
2. Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 2006; 66:575–587
3. Foster G, Osterman BJ, Godfroid J, Jacques I, Loeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seal as their preferred host. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; 57:2688–2693
4. Soloaga R, Salinas A, Poterallo M, Margari A, Suar B, Lucero N, Turco M, Procopio A, Almuzara M. Bacteriemia por *Brucella canis*. Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36 (2): 81-84
5. Carmichael LE, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell vet* 1987; 77:3 -12
6. Bosu WTK, Prescott JF. A serological survey of dogs for *Brucella canis* in Southwestern Ontario. *Can Vet J* 1980; 21: 198–200.
7. Wooley Jr RE, Brown J, Shotts EB, Blue JL, Dreesen DW. Serosurvey of *Brucella canis* antibodies in urban and rural stray dogs in Georgia. *Vet Med Small Anim Clin* 1977; 72: 1581–1584.
8. Flores-Castro R, Segura R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet* 1976; 66: 347–352.
9. Mateau de Antonio EM, Martin Castillo M. Encuesta seroepidemiológica frente a *Brucella canis* y brucelas de tipo liso en perros. *Med Vet* 1993; 10: 241–246.

10. Weber A, Schliesser T. Serologischer und kultureller Nachweis von *Brucella canis* bei Beagle-Hunden einer Versuchstierhaltung. Zentralbl. Veterinarmed B 1975; 22B:403–410.
11. Pilaszek J, Pilaszek M. Występowanie i zwalczanie brucelozy psów. Magazyn Weterynaryjny 2000; 9:28–29.
12. Sebek Z, Zykora I, Holda J, Komarek J. Serologický průkaz *Brucella canis* v chovu laboratorních psů plemene Beagle v Československu. Česk Epidemiol Mikrobiol Imunol 1976; 25:129–136.
13. Ciuchini F, Sala V, Pistoia C, Piccininno G, Pievaroli A, Fantini C. Brucellosi da *Brucella canis*: rilievi anticorpali su cani della città e del suburbio di Roma. Clin Vet 1982; 105:138–144.
14. Srinivasan VK, Nedunchelliyan S, Venkataraman KS. Prevalence of canine brucellosis in urban and rural areas of Tamilnadu. Indian J Med 1992; 12:39–40.
15. Baluyut CS, Dugui ES. A serological survey for *Brucella canis* agglutinins in dogs using the macroscopic tube agglutination test. Philip J Vet Med 1997; 16:93–101.
16. Park CK, Oh JY. Bacteriological and serological investigation of *Brucella canis* infection of dogs in Taegu city, Korea. Kor J Vet Res 2001; 41:67–71.
17. Jiang FX. A survey on canine brucellosis in Wusu county. Chin J Vet Sci Technol 1989; 1:18–19.
18. Katami M, Sato H, Yoshimura Y, Suzuki T, Suzuki Y, Nakano K, Saito H. An epidemiological survey of *Brucella canis* infection of dogs in the Towada area of Aomori prefecture (Japan). J Vet Med Sci 1991; 53:1113–1115.
19. Diker KS, Aydin N, Erdeger J, Ozyurt M. A serologic survey of dogs for *Brucella canis* and *Brucella abortus* and evaluation of mercaptoethanol microagglutination test. Ankara Univ Vet Fak Derg 1987; 34:268–276.
20. Joseph PG, Mahmud ZBH, Sirimanne ES. Canine brucellosis in Malaysia: a first report. Kajian Vet 1983; 15:17–22.
21. Tsai IS, Lu YS, Isayama Y, Sasahara J. Serological survey for *Brucella canis* infection in dogs in Taiwan and the isolation and identification of *B. canis*. Taiwan J Vet Med Anim Husb 1983; 42:91–98.
22. Adesiyun AA, Abdullahi SU, Adeyanju JB. Prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella canis* antibodies in dogs in Nigeria. J Small Anim Pract 1986; 27:31–37.
23. Azevedo SS, Vasconcellos SA, Alves CJ, Keid LB, Grasso LMPS, Mascoll R, Pinheiro SR. Inquerito sorológico e fatores de risco para a brucelose por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. Pesq Vet Bras 2003; 23:156–160.
24. Baruta DA, Ardoino SM, Riesco SR, Marengo ML, Brandan JL, Oriani DS. Determinación de anticuerpos prevalentes contra brucelas específicas e inespecíficas en caninos en la ciudad de Gral. Pico (La Pampa). Selec Vet 2001; 9:415–418.
25. Zamora J, Alonso O, Martín R. Brucelosis canina en Valdivia Chile. Estudio serológico y bacteriológico en perros de ciudad. Zentralbl Veterinarmed B 1980; 27: 149–153.
26. Ulloa OE, Hernández LG. Estudio serológico de *Brucella canis* y *Brucella abortus* en caninos y humanos en el área urbana de la ciudad de Bogotá. [Trabajo de grado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; 1978.
27. Castillo VV. Encuesta serológica sobre *Brucella canis* en pacientes atendidos en la clínica de pequeños animales en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). [Trabajo de grado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia; 2002.

28. Jara S, Pérez OD, Di-Lorenzo C, Olivera M. Diagnóstico de brucelosis canina mediante aglutinación en placa en caninos de Medellín, Colombia. Rev Col Cienc Pec 2005; 18: 4.
29. Galphin SP. A serologic survey for *Brucella canis* in dogs on a military base. J Am Vet Med Assoc 1977; 8: 728 – 729.
30. Maia GR, Rossi CRS, Abbadi F, Vieira DK, Moraes IA. Prevalencia da brucelose canina nas cidades do Rio de Janeiro e Niteroi-RJ. Rev Bras Reprod 1999; 23:425 – 427.
31. Thiermann AB. Brucellosis in stray dogs in Detroit. J Am Vet Med Assoc 1980; 177(12): 1216 – 1217.
32. Boebel FW, Ehrenford FA, Brown GM, Angus RD, Thoen CO. Agglutinins to *Brucella canis* in Stray Dogs from Certain Countries in Illinois and Wisconsin. J Am Vet Med Assoc 1979; 175(3): 276-277.
33. Brown J, Blue JL, Wooley RE, Dreesen DW, Carmichael LE. A serologic survey of a population of Georgia dogs for *Brucella canis* and evaluation of slide agglutination test. J Am Vet Med Assoc 1976; 169 (11): 1214 – 1216.
34. Pillai T, Nedunchelligan S, Raghavan, N. Serological and bacteriological detection de brucella canis. Infections of dogs in Madras. Indian Vet J 1991; 68: 399 – 401.
35. Srinivasan VK, Nedunchelliyan S, Venkataraman KS. Seroepidemiology of canine brucellosis in Madras city. Indian Vet J 1992; 69: 978 – 980.