

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EVALUACION TERAPEUTICA DE LA
OXITETRACICLINA MICRONIZADA
INSOLUBLE, EN PERROS INFECTADOS
ARTIFICIALMENTE CON BRUCELLA CANIS**

T E S I S

que para obtener el título de :

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a :

CARLOS RAMIREZ PFEIFFER

1978

8097



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres

A mis hermanos

A Laura

A todas las personas que con su ayuda e
impulso hacen posible mi superación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia

A mis Asesores:

MVZ., DVM. Horst Richter Plate

MVZ. Abel Ciprian Carrasco

MVZ. Francisco Suárez Güemes

A mi Jurado:

MVZ., Mc. Juan Garza Ramos

MVZ. Alfredo Aguilar Valdez

MVZ., Mc. Gustavo García Delgado

MVZ., DVM. Horst Richter Plate

MVZ., Ph.D. Armando Shimada Miyasaka

Al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias

A los animales de Laboratorio

Agradezco la colaboración de las siguientes personas
que hicieron posible la realización de este trabajo de
Investigación:

MVZ., Dip., Ph.D. Ricardo Flores Castro

MVZ., Dip. Bact., Ph.D. Carlos Pijoan Aguadé

MVZ. Norma Ciprian Carrasco

MVZ., Ph. D. Leland E. Carmichael

Sr. Hector Najera Alcala

Srita. Leticia Ramírez Sánchez

Sr. Rafael Palma García

MAT., Ph. D. Dennis Hurley

Srita. Margarita Fernández Loperena

Este trabajo se realizó en el Departamento
de Bacteriología del Instituto Nacional de
Investigaciones Pecuarias, S.A.R.H.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	
1.- Antecedentes	1
2.- Etiología	3
3.- Especies afectadas	4
4.- Patología	4
5.- Signos clínicos	4
A) En ambos sexos	
B) En la hembra	
C) En el macho	
6.- Lesiones	6
A) En ganglios linfáticos	
B) En el bazo	
C) En el hígado	
D) En aparato reproductor	
a) en machos	
b) en hembras	
E) En los fetos abortados	
7.- Hallazgos ocasionales	7
8.- La enfermedad en el hombre	8
9.- Aspectos inmunológicos	8
10.- Diagnóstico	10
A) Clínico	
B) Serológico	
C) Bacteriológico	
11.- Prevención y control	13
12.- Tratamiento	15
13.- Objetivos	16
II. MATERIAL Y METODOS	
1.- Diseño experimental	18
2.- Animales en experimentación	18
3.- Tratamientos	20
4.- Exámen serológico	22
5.- Exámen bacteriológico	24
III. RESULTADOS	
A) Serológicos de los lotes A, B y C.	26
B) Bacteriológicos de los lotes A, B y C.	27
C) De la aplicación de la droga en lotes A, B y C.	28
D) De necropsias de los lotes A, B y C.	28
E) Serológico y Bacteriológico	29
F) Del análisis estadístico	30
IV. DISCUSION	32
V. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	38
VI. LITERATURA CITADA	39

RESUMEN

EVALUACION TERAPEUTICA DE LA OXITETRACICLINA MICRONIZADA INSOLUBLE, EN PERROS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON BRUCELLA CANIS

Ramírez Pfeiffer, Carlos.

Asesores:

MVZ. Horst Richter Plate

MVZ. Abel Ciprian Carrasco

MVZ. Francisco Suárez Güemes

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Bacteriología del Instituto - Nacional de Investigaciones Pecuarias; para lo cual se utilizaron 19 perros - raza Beagle infectados artificialmente con Brucella canis; mismos que se dividieron en dos grupos. El primer grupo constó de 13 perros con una infección no bacterémica, los que se separaron en tres lotes (A, B y C). A cada uno de los cinco perros que constituyeron el lote A, se les administró oxitetraciclina micronizada insoluble (OMI) a una dosis de 50 mg/semana por 6 semanas por vía subcutánea (S.C.). El lote B constaba de 5 perros a los que se les administró OMI (100 mg/semana por 6 semanas vía S.C.). El lote C con 3 perros permaneció como control. El segundo grupo con una infección bacterémica constó de 6 perros divididos en dos lotes (D y E). El lote D con 4 perros, a dos de los cuales se les administró OMI a dosis de 5 mg/kg cada 24 horas, 7 aplicaciones vía S.C. y estreptomycin 5 mg/kg cada 24 horas, 7 aplicaciones parenterales; a los dos perros restantes se les aplicó OMI en la misma dosis y vía que a los anteriores. El lote E constó de 2 perros - que permanecieron como controles de este grupo. Se realizaron estudios bacteriológicos y serológicos de los perros durante todo el experimento. Los resultados bacteriológicos finales de los grupos A y B fueron negativos, en los serológicos sólo en dos animales permanecieron con altos títulos. De los perros del grupo D solo uno fué negativo a las pruebas realizadas al finalizar el experimento. De los controles solo en uno del lote C no se aisló la B. canis pero este tenía títulos serológicos elevados. Se concluye que los resultados obtenidos en este estudio, si bien no son definitivos, sí demuestran el valor potencial terapéutico de OMI y se sugiere un uso en dosis semanales - de 100 mg cada semana durante 6 semanas.

Febrero 1978.

I. INTRODUCCION

1.- ANTECEDENTES

Desde hace 50 años se han presentado informes en los cuales se mencionan perros infectados con las especies clásicas de Brucella (Brucella abortus, Brucella melitensis y Brucella suis), mismas que mencionan que los caninos son relativamente resistentes a ellas (13).

En 1964 se presentaron cuadros clínicos de abortos e infertilidad en criaderos de perros Beagles de los Estados Unidos (3), lo que se consideraba era un problema viral. Más tarde en 1966 el Dr. Carmichael, virólogo de la Universidad de Cornell, falló en el intento de aislar el supuesto virus, sin embargo, asiló una bacteria a partir de los tejidos fetales y placentales, el que se identificó como la causa de los problemas (4).

Dicha bacteria era un cocobacilo gram negativo, la cual debido a sus características bioquímicas (6) y otros estudios como: homología del ácido desoxirribonucleico (25), electroforesis en el gel de poliacrilamida (36), metabolismo oxidativo, lisis por brucelófagos (32), microscopía electrónica, características de crecimiento, desarrollo en presencia de eritritol, lisis por lisozima, pruebas de toxicidad en ratones (27), así como su relación antigénica con otras brucelas lisas o rugosas (6,14,15,32,49,51, 52), la clasificaron dentro del Género Brucella, como una especie diferente a las ya conocidas. Varios de estos trabajos (14,27) apoyan la denominación propuesta por Carmichael y Bruner para llamarla Brucella ca-

nis (6). Por sus características bioquímicas y metabólicas es similar a la Brucella suis biotipos 3 y 4, por lo que otro autor propuso el nombre de Brucella suis biotipo 5 (32).

Debido a esto se han considerado factores genéticos incluyendo la especificidad de huésped para denominar la especie y así en 1970 el Subcomité de Taxonomía del Género Brucella aceptó provisionalmente el nombre de Brucella canis y como cepa de referencia la RM 6-66, como se encuentra publicado en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, en la 8a. edición (2).

Actualmente se ha visto que esta enfermedad se encuentra ampliamente - difundida en los Estados Unidos y se ha encontrado en otros países como - Japón (53), Perú (16,31), Alemania (50), Brasil (22). En México, Flores la observó por primera vez en 1975 (17), posteriormente en estudios serológicos se vió que 28.8% de perros callejeros de la ciudad de México tenían títulos significativos (18,45) y más tarde otro estudio encontró 11.8% de perros bacteriológicamente positivos, que es la mayor prevalencia citada en el mundo (19).

La brucelosis canina es una zoonosis y en los Estados Unidos se presentaron de 1967 a 1974, 16 casos de brucelosis humana, causada por Brucella canis, (11,24,37,48), en México un estudio serológico sobre la presencia de anticuerpos contra Brucella canis en humanos, reveló 13.3% de sueros con títulos elevados, empleando las pruebas de aglutinación en placa y -

tubo (18,19). A pesar de la alta prevalencia de perros infectados con Brucella canis y el alto número de sueros de humanos con títulos que sugieren infección, no se ha logrado el aislamiento de esta bacteria a partir de humanos.

2.- ETIOLOGIA

Morfología: La Brucella canis es una bacteria cocobacilar de 0.5×0.5 a 2μ , gram negativa, en la observación microscópica se presenta generalmente aislada y ocasionalmente en pares o cadenas cortas, su cultivo es aerobio y su temperatura óptima de crecimiento son 37 C. A las 36-48 horas de crecimiento en medio Albimi agar se observan pequeñas colonias visibles de 1 a 1.5 mm. que tienden a adherirse al agar, siendo más pequeñas en su primer aislamiento, en caldo hay moderada turbidez en 48 hrs. de incubación formando sedimento varios días después (5,6,-33) que al agitarse forma un "cordón" característico. En los cuadros 1 y 2 se presentan las características bioquímicas y de crecimiento del germen en presencia de colorantes (6).

Características antigénicas: El germen no posee los antígenos lisos A y M de la Brucella abortus y melitensis respectivamente, no contiene endotoxina lipopolisacárida asociada a especies lisas de brucelas (10), cruza antigénicamente con brucelas rugosas como Brucella ovis y Brucella abortus cepa 45/20 (9,27), y posiblemente con otros géneros gram negativos como Bordetella spp, Pasteurella spp. y Haemophilus spp. (9,14,27).

CUADRO No. 1

PRUEBAS BIOQUIMICAS DE BRUCELLA CANIS

PRUEBAS BIOQUIMICAS:	REACCION
Producción de Ureasa	+++
Producción de Catalasa	+++
Oxidasa	+
Producción de Acido Sulfhídrico	+ (1 semana)
Reducción de Nitratos	+
Rojo de Metilo - Voges Proskauer	-
Indol	-
Licuefacción de Gelatina	-
Crecimiento en Mac Conkey	-
Utilización de Citrato	-
Fermentación de Carbohidratos	-

CUADRO No. 2

CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE COLORANTES

FUCSINA BASICA		TIONINA	
1:50000	1:100000	1:50000	1:10000
-	+++	++	+++

Tomados de Cornell Vet. (1968), 58, 4:579-592.

3.- ESPECIES AFECTADAS

Los perros son los principales huéspedes naturales de la Brucella canis, - en un principio se creyó que afectaba sólo a la raza Beagle, (5,46) pero actualmente se conoce que afecta a todas las razas, a cualquier edad y a ambos sexos (9).

El hombre también es susceptible, adquiriéndola principalmente a partir de perros infectados y por infecciones en el laboratorio, en él las mismas vías de infección que en el perro (9,11,48).

Experimentalmente se ha visto que los cerdos, ovinos y bovinos, son altamente resistentes a la infección por Brucella canis y que los gatos son -- susceptibles a la infección, aunque en menor grado que los perros (38,39).

4.- PATOGENIA

La Brucella canis se elimina principalmente durante el aborto, habiendo -- gran cantidad de microorganismos en el feto abortado y en las descargas -- vaginales que le suceden; asimismo, se elimina a través de la orina y semen de machos infectados, las principales vías de entrada al organismo -- son a través de mucosas oral-faríngea, tracto genital y conjuntiva. En el esquema No. 1, se observa la patogenia de la enfermedad en perros (8).

5.- SIGNOS CLINICOS

Los signos clínicos han sido citados por diversos autores (3,7,8,29,34,35, 46,49) y son generalmente:

ESQUEMA 1

Patogénesis de Br. canis, en machos sexualmente maduros.

Puerta de entrada: (membranas mucosas del tracto genital, conjuntiva, oral).

↓
Fagocitosis por leucocitos: (neutrófilos, macrófagos ?).

↓
Nódulos linfáticos regionales: (multiplicación bacteriana, trata de localizarse), nódulos retrofaríngeos (vía oral o conjuntiva); inguinales e ilíacos (entrada genital).

↓
Bacteremia: (asociada a leucocitos de 6 - 18 meses de duración).

↓
Multiplicación bacteriana de otros tejidos:

1.- Cels. reticuloendoteliales de bazo, nódulos linfáticos, hígado.

- hiperplasia de cels. reticulares.
- hiperplasia de centros germinales.
- formación de granulomas.

2.- Tracto genital:

- placenta, hembras preñadas.
- epididimitis y próstata en machos.

↓
Respuesta inmune:

- a- anticuerpos (tipos de inmunoglobulinas, secuencia de producción, ?).
- b- macrófagos inmunes (inmunidad celular ?).
- c- formación de complejos inmunes ?.
- d- hipersensibilidad ?.

↓
Lesiones inmunopatológicas (?): arteritis
linfadenitis, esplenitis.

Eliminación de organismos:

- a- orina, semen.
- b- descargas uterinas, tejidos fetales abortados.
- c- otros, (leche, heces, saliva) ?.

Inmunidad: Modo de resistencia.
 Duración ?.

A) En ambos sexos.

Los perros infectados artificialmente por vía oral tienen aumentados los ganglios retrofaríngeos y las hembras infectadas por vía vaginal, los ganglios inguinal superficial e ilíaco externo. En ambos casos los ganglios son fáciles de palpar aproximadamente dos semanas después de la inoculación, posteriormente hay un grado variable de aumento e induración de la mayoría de los ganglios, asimismo es notoria la ausencia de fiebre a pesar de la prolongada bacteremia (bacterias circulando en sangre) de hasta dos años de duración que puede ser intermitente o cesar definitivamente al localizarse el germen en tejidos, la falta de respuesta febril se podría explicar por la poca cantidad o ausencia de endotoxina lipopolisacárida de la Brucella canis.

B) En hembras.

a) No gestantes: hiperplasia generalizada de ganglios linfáticos.

b) Gestantes: el principal signo es el aborto entre los días 40-50 de gestación, seguido de descargas vaginales prolongadas de 1 a 6 semanas de duración, de color serosanguinolento o verde grisáceo; o bien nacen cachorros débiles que mueren en 24-48 horas. Se observan también muertes embrionarias tempranas indetectables, pero no se ha observado esterilidad. Una hembra infectada, normalmente aborta una vez y posteriormente tiene períodos normales de gestación, sin embargo, en algunos casos pueden abortar dos ó tres veces.

C) En el macho: hay hiperplasia generalizada de ganglios linfáticos, epi-

didimítis, prostatitis, orquitis, atrofia testicular, dermatitis escrotal que es causada principalmente por estafilococos no hemolíticos que invaden el escroto probablemente debido a la irritación que produce por lamerse frecuentemente a consecuencia del dolor que les causa la epididimítis, hay pérdida del líbido.

6. - LESIONES

Las lesiones macro y microscópicas han sido ampliamente descritas por diferentes autores (8,9,34,35): A la necropsia se observa lo siguiente:

Linfadenitis generalizada, esplenomegália, epididimítis y dermatitis escrotal.

En el estudio histopatológico se observa más frecuentemente lo siguiente:

A) En ganglios linfáticos: hiperplasia de nódulos linfoides con linfocitosis difusa e infiltración de linfocitos en las estructuras perinodulares y espacio subcapsular, presencia de macrófagos y células plasmáticas, los macrófagos tienen bacterias fagocitadas.

B) En bazo: las lesiones son similares, pero se observa más frecuentemente hiperplasia de fibras reticulares y proliferación de células plasmáticas, también presencia de células gigantes multinucleadas y de histiocitos con colonias de bacterias en su interior.

C) Hígado: casi siempre normal, aunque en ocasiones tiene pequeños focos de acumulación de células mononucleares, linfocitos, plasmocitos y neutrófilos rodeando las venas centrales.

D) Aparato reproductor:

a) En machos: infiltración linfocitaria generalizada en próstata, con destrucción del parenquima glandular adyacente, presencia de fibroblastos, degeneración de túbulos seminíferos con espermatogonias y células de Sertoli en su lumen. En casos más avanzados hay pérdida total de los túbulos seminíferos y reemplazo de estos por tejido fibroso. En perros que desarrollan atrofia testicular bilateral se encuentra azoospermia y presencia de células inflamatorias únicamente en el eyaculado.

b) En las hembras que acaban de abortar se observa marcada hipertrofia del tejido glandular del útero con infiltración local de la lámina propia por linfocitos y pequeños granulomas infiltrados de neutrófilos. En el lumen uterino restos de placenta con necrosis focal coagulativa de las vellocidades coriónicas como lesión principal.

E) En los fetos abortados: se encuentra hiperemia y hemorragia en el tejido subcutáneo del abdomen, los cachorros que nacen vivos y mueren poco después (24-42 horas) presentan comunmente bronconeumonía, miocarditis, linfadenitis, hepatitis, hemorragia renal generalizada con infiltración del intersticio glandular y perivascular de células reticulares.

7.- HALLAZGOS OCASIONALES

Reike y Col. (41) informan haber realizado el aislamiento de Brucella canis en cultivo puro a partir del humor acuoso de un ojo atrofiado de un perro Pastor Alemán; Henderson y Col. (23) aislaron Brucella canis de un -

perro con signos de mialgia, debilidad y dolores espinales a partir de espacios intervertebrales con lesiones de discopondilítis, aunque la relación de Brucella canis y tejido óseo no está bien establecida (9). Otra lesión citada en perros infectados artificialmente con Brucella canis, es una meningitis crónica y encefalitis focal no supurativa (10), causa probable de cambios de conducta de los perros, los que se pueden volver agresivos (Carmichael, comunicación personal 1977).

8.- LA ENFERMEDAD EN EL HOMBRE

Los signos clínicos son similares a los observados en otras brucelosis: fiebre intermitente, cefalea, escalofríos, debilidad, mialgias, sudoración y pérdida de peso, en ocasiones los pacientes son asintomáticos (9,11,48).

Los pacientes estudiados por Carmichael (9) han tenido títulos altos de 1:200 ó mayores en aglutinación en tubo, en el mismo trabajo, menciona el caso de una trabajadora gestante que se infectó y abortó, aunque no se logró aislar la Brucella canis, a partir de tejidos placentales y de exudados vaginales.

9.- ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Estudios realizados por Carmichael y Col. (8) revelaron que perros infectados y mantenidos por dos años en unidades de aislamiento fueron inmunes a una reinoculación cuando sus títulos bajaron a 1:50 ó menos y había cesado la bacteremia. La reinoculación se hizo por vía oral con una dosis de 1×10^7 a 1×10^8 organismos viables y ninguno de los perros -

presentó bacteremia ni un aumento en sus niveles de aglutininas.

La infección intracelular de la brucela se caracteriza por desarrollar estados de hipersensibilidad en el animal enfermo, sin embargo, no se ha podido desarrollar un alérgeno para realizar una prueba de hipersensibilidad cutánea en perros (8). Para humanos existe un alérgeno a base de una cepa rugosa de Brucella melitensis (cepa B 115), o de una cepa de Brucella suis (1).

Spink (46) realizó estudios sobre la naturaleza de las inmunoglobulinas en perros infectados con Brucella canis y encontró anticuerpos aglutinantes - 19S en forma pura y tres formas de anticuerpos aglutinantes 7S. Asimismo ha hecho estudios sobre el mecanismo de defensa celular y humoral en perros infectados naturalmente y ha visto que tienen una mínima actividad bactericida, aunque el efecto de los leucocitos polimorfonucleares no es solo fagocítico sino también bactericida. Estudios realizados por Carmichael y Col. (9,10) mencionan que en el plasma seminal de perros infectados por un período de dos meses ó mayor, se han encontrado inmunoglobulinas que han sido caracterizadas, una como IgA que es capaz de aglutinar a espermatozoides vivos de perros normales, además ha encontrado también una inmunoglobulina citofílica (IgG), la que al ponerse en contacto con espermatozoides normales (sensibilizados) y con macrófagos produce un aumento en la citoadherencia, reacción que aumenta la fagocitosis, lo que sugiere que la infertilidad en el macho, puede ser debida en parte a reacciones isoimunes resultantes de la elevada actividad fagocítica de células inflamatorias que -

atacan los sitios de crecimiento de la brucela en el epidídimo.

10.- DIAGNOSTICO

A) Clínico

La Brucella canis debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de enfermedades en las que haya historia de abortos, infertilidad, alteraciones en testículos e hiperplasia de nódulos linfoides. Una característica importante es la ausencia de fiebre. Se requieren pruebas de laboratorio para confirmar la enfermedad, utilizándose para esto métodos serológicos y bacteriológicos.

B) Serológico

Este tipo de diagnóstico como en las otras infecciones por brucelas es solo una parte del esfuerzo para establecer la presencia o ausencia de esta enfermedad (9).

Se han elaborado varios métodos de diagnóstico, sin embargo, hasta la fecha no existen procedimientos estandarizados, ni se cuenta con sueros de referencia (10).

Hasta hace poco el diagnóstico se basaba en pruebas de tubo, pero tiene el inconveniente de que la Brucella canis autoaglutina bajo ciertas condiciones de pH y concentración de sales. Posteriormente se vió que la temperatura que requería era de 50-52 C, a veces la aglutinación es incompleta, otros inconvenientes es que requiere 48 horas, que la sangre de pe-

ro hemoliza rápidamente y que la prueba requiere de muestras de suero no hemolizadas, ya que hay precipitación del antígeno con hemoglobina desnaturalizada por calor. Sin embargo, esta prueba es una ayuda en el diagnóstico (9,10).

Se han desarrollado actualmente varias técnicas, como es la modificación de la prueba de mercaptoetanol empleando 3.5% NaCl y 2-Mercaptoetanol con antígeno formalizado 0.6% (1,7), a pesar de que este método parece satisfactorio, no hay reportes de su exactitud (10). Otras técnicas son: fijación del complemento, difusión en gel y prueba rápida en placa (21), las que tienen diferentes grados de confiabilidad en sus resultados - (9).

Se considera que con la prueba de aglutinación en tubo títulos de 1:100 ó mayores son positivos debido a que los animales con esos títulos resultan frecuentemente positivos al aislamiento de Brucella canis en hemocultivos, mientras que con la prueba en tubo de 2-Mercaptoetanol (M.E.) - 1:200 es el título considerado positivo (9).

La prueba rápida de aglutinación en placa (PRP) (21) ha demostrado ser muy útil y rápida, sin embargo, tiene el problema de dar "falsos positivos", en contraste no hay informes describiendo "falsos negativos" (6).

Generalmente la bacteremia persiste por varios meses (hasta dos años) pudiendo ser intermitente, mientras tanto los títulos serológicos son elevados

hasta 1:400 en aglutinación en tubo y en placa pero bajan rápidamente al cesar la bacteremia, pudiendo persistir a niveles de 1:25 ó 1:50 con aglutinación parcial ya que la Brucella canis puede localizarse en ciertos tejidos, como epidídimo por largos períodos (9,20).

C) Bacteriológico

La única manera de confirmar la enfermedad es por medios bacteriológicos aislando el organismo a partir de hemocultivos o biopsias de ganglios linfáticos y médula ósea, siendo estos dos últimos en cierta medida difíciles de realizar, Carmichael (7) en un estudio realizado sobre la frecuencia de aislamiento de Brucella canis a partir de tejidos encontró los resultados que muestra el Cuadro No. 3.

Para hemocultivos es recomendable utilizar el medio de Kuzdas y Morse (1). El hemocultivo se hace en tubos con 4 ml de medio líquido, 2 ml de sangre total, se incuba a 37 C x 4 a 7 días y se resiembró luego de éstos a medio sólido en placas incubándose por 7 días.

El medio Thayer Martin* utilizado originalmente para Neisseria gonorrhoeae es efectivo para primoaislamiento de Brucella canis ya que aparte de tener inhibidores de contaminantes es un medio enriquecido, lo que favorece su crecimiento. Este medio ha sido empleado también satisfactoriamente en el aislamiento de Brucella ovís (1,19).

* Lab. Gibco USA.

CUADRO No. 3

Aislamiento de Brucella canis a partir de órganos

(Carmichael, comunicación personal 1977)

ORGANO	CRECIMIENTO
- Ganglios linfáticos	
Retrofaríngeos	+++
Inguinales	+++
Mesentéricos	++
- Médula ósea	+++
- Bazo	++++
- Hígado	+++
- Próstata	+++
- Testículos	+
- Epidídimo	++
En tejidos fetales y maternos abortados	
- Placenta	++++
- Líquido alantoideo	++++
- Hígado	+++
- Nódulo linfático (mesentérico)	+++
- Hígado	++
- Pulmones	++

11.- PREVENCIÓN Y CONTROL

En la actualidad no se ha encontrado una forma de prevención. El uso de bacterinas no ha tenido éxito a menos que se emplee un adyuvante del tipo de Freund, pero tiene el inconveniente de que produce áreas de inflamación intensa, abscesos estériles y tejido cutáneo necrótico en el sitio de inoculación, de esta forma se ha logrado una inmunidad hasta seis meses. El uso de la variante lisa-mucosa (S-R) de Brucella canis viva de baja antigenicidad y patogenicidad protege a los perros hasta por 14 meses, aunque produce una bacteremia prolongada e hiperplasia de tejido linfático, pero sin revertir al tipo patógeno rugoso (R), (8).

El control es muy variable respecto en efectividad, Lewis (29) sugiere el siguiente método de control, en caso de sospechar infección de Brucella canis en un criadero.

- 1.- Aislamiento inmediato de hembras que hayan abortado o tengan descargas vaginales anormales, machos con epidídimos aumentados de tamaño y/o testículos aumentados de tamaño, y cualquier animal con ganglios linfáticos aumentados de tamaño.
- 2.- Colección de sangre de todos los perros de la colonia, incluyendo aquellos en aislamiento, para serología y cultivo.
- 3.- Poner todos los perros nuevos en perreras no infectadas hasta que la colonia se declare libre de Brucella canis. Esos perros nuevos se deben -

sangrar para serología y hemocultivos.

- 4.- Eliminar todos los perros bacterémicos o que tengan títulos de 1:100 ó superiores a Brucella canis en la prueba de tubo. Los perros con un título menor a 1:100 o que no tengan títulos deben ser probados mensualmente hasta que cada perro tenga dos resultados negativos -- consecutivos.
- 5.- Cualquier perro que se le haya aislado Brucella canis de sangre o tejidos se debe eliminar.
- 6.- Los locales se deben lavar y desinfectar diariamente, de preferencia con un compuesto que contenga yodo.
- 7.- Se deben tener ropa y batas por separado para cada sección de la colonia, particularmente entre perros aislados sospechosos, nuevas adquisiciones y los perros libres de la enfermedad.
- 8.- Se debe tener cuidado en la limpieza de jaulas contaminadas y manejo de perros infectados, se debe hacer con guantes desechables y -- máscaras quirúrgicas.
- 9.- No permitir que perros previamente infectados, con bajos títulos o -- que haya tenido una "cura espontánea" mientras estaba en aislamiento entre a la colonia.

Pickerill (40) llevó a cabo un método similar y obtuvo como resultado un

criadero libre de brucelosis el cual producía un promedio de 6.24 cachorros-hembra-año que se había reducido a 1.51 cachorros-hembra-año durante la infección.

Actualmente en los criaderos de los Estados Unidos es práctica común -- mantener a los perros con niveles bajos de antibióticos y otros agentes terapéuticos, por ejemplo tetraciclina, dados en agua o comidas, práctica que no ha sido evaluada, sin embargo, es posible que este método -- aún cuando hembras infectadas no aborten, no tenga ningún efecto curativo y enmascare la enfermedad y además llegue a crear resistencia del germen a este antibiótico (8,28).

Una medida de control para perros infectados es la orquiectomía, lo que es posiblemente impida que el animal siga diseminando la enfermedad (9).

12.- TRATAMIENTO

Una característica del género Brucella es de ser microorganismos intracelulares, lo que le permite mantenerse fuera del alcance de antibióticos, a los que son susceptibles in vitro (20,43).

A partir del aislamiento de Brucella canis (3), se ha intentado el tratamiento con tetraciclina, cloramfenicol, dihidroestreptomicina, así como sulfonamidas, las que son efectivas in vitro, pero que al ser administradas -- aún en grandes cantidades y largos períodos a perros infectados han tenido efecto sobre la bacteremia únicamente, persistiendo la infección intra-

celular. Manifestándose de nuevo la bacteremia, tiempo después de terminado el tratamiento. Resultados similares se han obtenido al hacer mezclas de dos de ellos (5,26,30).

Un informe sobre el valor terapéutico de la tetraciclina y la ampicilina - en perros infectados con Brucella canis indica que se comportan solo como bacteriostáticos en el organismo y que después de cesar el tratamiento aparece la bacteremia (30).

Otros autores (26) emplearon un régimen terapéutico en dos etapas, primero administraron ampicilina o tetraciclina por tres semanas y después de - un corto período administraron tetraciclina con estreptomicina por tres semanas, obteniendo resultados parcialmente positivos.

El uso de fármacos para el tratamiento de brucelosis en pacientes diferentes a la especie humana no es recomendable, dado que existen pocos de - ellos que tengan un efecto curativo eficaz, aún administrando en grandes dosis y por largos períodos, sin embargo, el canino es una excepción ya que muchas veces forma parte literalmente de la familia que lo posee, -- por lo que es necesario tener un tratamiento a la mano para su curación.

13.- OBJETIVOS

Es necesario debido a la importancia que ha venido cobrando esta enfermedad, tanto a nivel de Medicina Veterinaria como de Salud Pública, - obtener un tratamiento eficaz para la terapia de perros infectados con - Brucella canis.

Esta tesis tiene como objetivo evaluar la acción terapéutica de la oxite-traciclina micronizada insoluble (OMI)* en perros infectados artificialmen-te con Brucella canis, medicamento que ha sido empleado con resultados satisfactorios en brucelosis humana, causada por diferentes brucelas (42,-43,44).

* OXI MICRON F. Lab. RAFERSA, México.

II. MATERIAL Y METODOS

1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el objeto de evaluar la efectividad de la oxitetraciclina micronizada insoluble (OMI)* para el tratamiento de la brucelosis canina causada por Brucella canis, se trataron con esta droga animales previamente inoculados con una cepa de Brucella canis aislada por Flores (17) a partir de hemocultivos de perros colectados en el Centro Antirrábico del Distrito Federal. El Cuadro No. 4 contiene en forma resumida el diseño experimental empleado.

2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Inicialmente se emplearon 13 perros de raza Beagle susceptibles a Brucella canis los cuales se dividieron en tres grupos (A, B y C) que se mantuvieron separados entre sí, pero sometidos a condiciones similares de manejo y alimentación. Los perros de los tres lotes (A, B y C), los que se inocularon con Brucella canis con una dosis de 5×10^6 unidades formadoras de colonias, los machos por vía oral y las hembras por vía oral y vaginal simultáneamente.

Lote A. Incluyó cinco perros que se infectaron nueve meses antes de empezar el tratamiento, se numeraron del No. 1 al No. 5.

Lote B. Contaba con cinco perros, tres de ellos tenían nueve meses de -

CUADRO No.4

DISEÑO EXPERIMENTAL

TRATAMIENTO DE LA BRUCELOSIS CANINA (NO BACTEREMICA) EMPLEANDO OXITETRACILINA MICRONIZADA INSOLUBLE

Lote	No. de perros	Tiempo de la infección al tratamiento (meses)	Dosis del fármaco empleado. (mg/semana)	vía de administración	Duración del tratamiento (semanas)
A	1	9	50	sc	6
	2	9	50	sc	6
	3	9	50	sc	6
	4	9	50	sc	6
	5	9	50	sc	6
B	6	9	100	sc	6
	7	9	100	sc	6
	8	9	100	sc	6
	9	18	100	sc	6
	10	18	100	sc	6
C	11	18	-	-	-
	12	18	-	-	-
	13	18	-	-	-

infectados y los otros dos 18 meses antes de empezar el tratamiento, se les numeró del No. 6 al 10.

Lote C. Contaba con tres perros con una infección de 18 meses y se numeraron del No. 11 al No. 13.

Los animales fueron sangrados cada semana desde el momento en que se inició el tratamiento, hasta que fueron sacrificados. La sangre y suero - fueron empleados para estudios serológicos y bacteriológicos, ya que de esta forma es posible seguir el curso de la infección.

Un experimento adicional se realizó en combinación con personal del -- Jamis A. Baker Institute for Animal Health, Cornell University (JABIAH). Seis perros de la raza Beagle libres de patógenos específicos (SPF), fueron inoculados por vía oral con una suspensión conteniendo aproximadamente 1×10^9 organismos vivos de la cepa de referencia (RM 6-66) de Brucella canis. Se colectaron muestras de sangre de los seis animales -- con intervalos de dos semanas, durante seis meses con el objeto de determinar la presencia de brucelas en sangre y establecer los niveles de anticuerpos antes, durante y después del tratamiento. Cuatro de estos - animales fueron tratados y dos más se emplearon como controles sin tratamiento. El tratamiento se inició tres meses después de la inoculación experimental y cuando los seis animales se encontraban bacterémicos y - presentaban títulos elevados de anticuerpos detectados mediante pruebas de aglutinación en placa, tubo y mercaptoetanol e inmunodifusión en -

gel. El grupo tratado y el grupo con los dos controles fueron identificados como lote D y E respectivamente. El diseño experimental de esta parte se encuentra en el Cuadro No. 5. Se aplicó un análisis estadístico por medio de X^2 (forma de Pearson) y "La prueba exacta de Fisher", para observar que porciento de animales tratados se curan con respecto a los del grupo control. Para precisar la eficiencia del medicamento, se formó un "intervalo de confianza" para el porcentaje de animales que se curarían con el tratamiento* (47).

3.- TRATAMIENTOS

El tratamiento se realizó con dos diferentes concentraciones.

- a) Para el lote A se emplearon 50 mg de oxitetraciclina micronizada a la semana.
- b) Para el lote B se emplearon 100 mg de oxitetraciclina micronizada a la semana.
- c) Para el lote Control no se aplicó tratamiento.

Se dieron seis aplicaciones a cada lote tratado. Al término del tratamiento se mantuvieron a los perros durante tres semanas antes de empezar a sacrificarlos, con el fin de observar si había efecto residual del medicamento, así como para esperar que las concentraciones del mismo disminuyeran y no impidieran el crecimiento posible de la Brucella canis a partir de tejidos.

El sacrificio se realizó con sobredosis de pentobarbital sódico*. De la se-

*(anestesal - Lab. Norden)

CUADRO No. 5
DISEÑO EXPERIMENTAL

TRATAMIENTO DE LA BRUCELOSIS CANINA (BACTEREMICA) EMPLEANDO OXITETRACICLINA
MICRONIZADA INSOLUBLE Y ESTREPTOMICINA

Lote	Ident.	Tiempo de la infección al tratamiento	Fármaco empleado	V í a	Posología
D	d ₁	3 meses	OMI Estreptomicina	Subcutánea Parenteral	7 de 50 mg, una cada 48 hrs. 7 de 5 mg/kg, una cada 24 hrs.
	d ₂	3 meses	OMI Estreptomicina	Subcutánea Parenteral	7 de 50 mg, una cada 48 hrs. 7 de 5 mg/kg, una cada 24 hrs.
	d ₃	3 meses	OMI	Subcutánea	7 de 50 mg, una cada 48 hrs.
	d ₄	3 meses	OMI	Subcutánea	7 de 50 mg, una cada 48 hrs.
E	e ₁	3 meses	-	-	-
	e ₂	3 meses	-	-	-

mana 47 a la 51 se sacrificaron un perro del lote A y uno del B cada semana y en las semanas 47, 49 y 51 se sacrificó un perro del lote -- control.

Se practicaron necropsias y se tomaron muestras de sangre, ganglios retrofaríngeos, mesentéricos, preescapulares, así como de hígado, bazo, testículos y epidídimo, de las que se intentó el aislamiento del germen.

d) Los cuatro perros tratados durante el estudio adicional, recibieron en total siete aplicaciones de OMI, por vía subcutánea. Cada inyección contenía 50 mg de droga y fueron administradas con 2 días entre tratamiento. Los perros de este grupo identificado como d₁, d₂, d₃, y d₄, se subdividieron en dos fracciones. En la primera fracción los perros d₁ y d₂ recibieron además de OMI, 5 mg de estreptomicina/kg cada 24 horas durante 7 días por vía parenteral. En la segunda fracción los perros de d₃ y d₄ sólo recibieron OMI.

e) El grupo E conteniendo los controles del estudio adicional se -- mantuvo sin tratamiento, estos animales se identificaron e₁ y e₂.

Todos los perros de los grupos D y E fueron sacrificados mediante sangría total cuando se encontraban bajo anestesia a nivel quirúrgico. Los animales d₁ y d₂ fueron sacrificados dos meses después de suspender el tratamiento. Los animales restantes en este grupo (d₃ y d₄) al igual de los controles e₁ y e₂ se sacrificaron 5 meses después de culminar el -- tratamiento, al momento del sacrificio se colectaron muestras de sangre

para determinar títulos de anticuerpos y posible bacteremia.

Durante la necropsia se colectaron, asépticamente, secciones de bazo, - ganglios linfáticos (retrofaríngeos, preescapular, inguinal interno y mesen- térico), médula ósea y en el caso de los machos se incluyeron secciones de próstata, epidídimo y testículo.

4.- EXAMENES SEROLOGICOS

Se practicó la prueba rápida de aglutinación en placa para lo cual se em pleó un antígeno heterólogo rugoso de Brucella ovis cepa REO 1182, te- ñida con rosa de bengala a un volumen celular final de 6% (proporcione da por L.E. Carmichael, James A. Baker Institute for Animal Health. -- Cornell University. USA)

La prueba se realizó con suero sanguíneo el cual se colocó en una pla- ca de cristal 0.04, 0.02 y 0.01 ml además de 0.05 ml de antígeno. El suero y el antígeno se mezclaron con asa de metal quedando una dilu- ción final de 1/50, 1/100 y 1/200 respectivamente. La placa se movió constantemente hasta realizar la lectura a los 5 minutos en un Aglutinos copio.

La interpretación de la prueba se hizo considerando sólo dos grados de aglutinación (completa e incompleta) de la siguiente forma (Cuadro No. 6).

En el caso de los animales incluidos en los grupos D y E, los niveles -

CUADRO No. 6

INTERPRETACION DE LA PRUEBA RAPIDA EN PLACA

Suero (ml.)	Dilución	Aglutinación	Interpretación
0.04	1/50	negativa	negativo
0.04	1/50	incompleta	negativo
0.04	1/50	total	sospechoso
0.02	1/100	incompleta	sospechoso
0.02	1/100	total	positivo
0.01	1/200	incompleta	positivo
0.01	1/200	total	positivo
0.005	1/400	incompleta	positivo
0.005	1/400	incompleta	positivo

de anticuerpos se determinaron empleando además la prueba de aglutinación en tubo, aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y la prueba de inmunodifusión en gel.

Para el método de aglutinación en tubo se empleó antígeno producido en el JABAIAH, usando la cepa de referencia RM 6-66 de Brucella canis, inactivada durante 2 horas a 56 C y con la incorporación de merthiolate (1:10000). La concentración del antígeno fue estandarizada en base a la densidad óptica $DO=0.185$ en una longitud de onda de 420μ . La técnica fue realizada de acuerdo con lo descrito por Carmichael (5).

Para la prueba de aglutinación en tubo, en presencia de 2-mercaptoetanol, se siguió la técnica descrita por Alton y Col. (1) y para el efecto se usó antígeno producido por el Veterinary Services Laboratory (USDA, Ames, Iowa.) Este antígeno está preparado también con Brucella canis pero inactivada con formalina.

En adición al antígeno, se emplea una solución 0.1 M de 2-mercaptoetanol, con el propósito de inactivar anticuerpos IgM, por lo que con esta prueba se supone que la reacción observada ocurre principalmente con anticuerpos de la clase IgG.

La inmunodifusión en gel se lleva a cabo empleando la técnica descrita por Flores y Col. (19). En esta prueba se usa antígeno soluble extraído de la cepa RM 6-66 de Brucella canis mediante el uso de desoxicolato sódico al 1% en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2. Se emplea-

ron laminillas de plástico conteniendo 0.8% agarosa en una solución amortiguadora de ácido bórico con pH 7.2, en presencia del antígeno soluble los sueros positivos originan 2 - 3 líneas de precipitación que se fusionan completamente con las producidas por sueros positivos usados como controles, ver fotografía (1).

5.- EXAMENES BACTERIOLOGICOS

1. Medios de cultivo

A) Generales

a) Agar y caldo tripticasa soya*

b) Agar y caldo triptosa*

B) Selectivos con inhibidores de contaminantes

a) Agar de Thayer Martin**

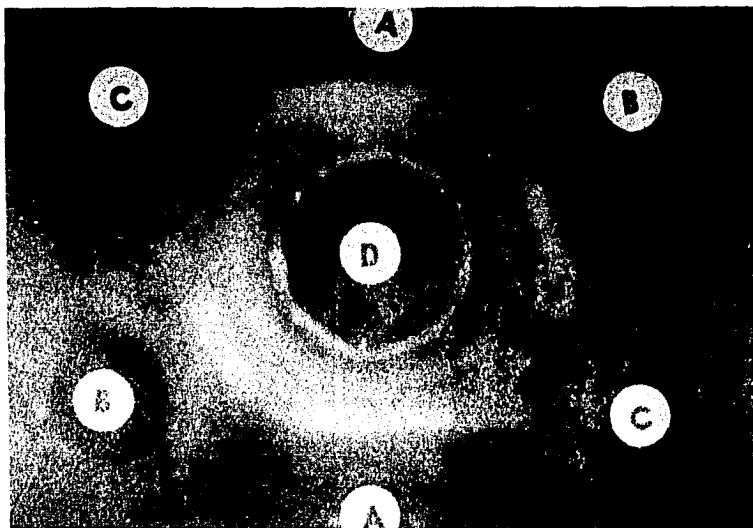
b) Kuzdas y Morse (1,8)

Las muestras de sangre semanales, así como los órganos obtenidos a la necropsia se sembraron en medio caldo de Kuzdas-Morse y resembraron en el mismo medio en placa cada tres días durante siete días. Asimismo de los órganos obtenidos a la necropsia otra parte se sembraron directamente a medio agar de Thayer Martin y se incubaron durante siete días, dándose negativos si no había crecimiento en este tiempo.

Las pruebas de fermentación de carbohidratos, producción de ácido sulfhídrico, hidrólisis de urea, actividad de la catalasa y de la oxidasa y

* Difco Laboratories USA

** Gibco USA



Inmunodifusión en gel.

A.- Anti B. canis suero control positivo

B.- Suero de animal en experimentación

C.- Sueros controles negativos

D.- Antígeno soluble de B. canis (RM 6-66)
extraído con 1% desoxicolato.

la reducción de nitratos se hicieron de acuerdo a los procedimientos descritos por Cowan y Steel (12) y por Alton Jones y Pietz (1). (Ver Cuadro No. 1).

III. RESULTADOS

Los resultados de los estudios practicados en los lotes A,B y C se encuentran resumidos en el Cuadro No. 7, los Cuadros 8,9,10 y 11 contienen - los resultados del estudio adicional con los lotes D y E.

A) Resultados de los estudios serológicos de los lotes A,B y C.

1.- En el lote A, los perros mostraron altos títulos serológicos desde la segunda o tercera semana de inoculación, excepto el perro número 5, el cual nunca mostró altos títulos serológicos, dado que esta animal fué resistente a la infección experimental, fué eliminado del estudio. Al empezar el tratamiento (semana 38), en los perros persis--tían los altos títulos serológicos, aunque el perro No. 4 los había - bajado a un nivel considerado como "sospechoso"; durante el tratamiento los perros empezaron a declinar sus títulos paulatinamente y este - descenso se hizo más marcado a medida que aumentaba el número de aplicaciones de la oxitetraciclina, llegando a un nivel considerado - como "sospechoso" a la tercera aplicación y "negativo" a la quinta - aplicación.

El perro número 3, mantuvo sus títulos con variantes dentro de los níveles considerados como "positivos", durante el período de terapia.

En la gráfica No. 1, se puede observar el promedio de la concentración de anticuerpos, en el cual no se incluyó al perro número 3, debido a que su comportamiento fué en forma independiente al resto del

CUADRO No. 7

RESULTADOS DE ESTUDIOS SEROLOGICOS Y BACTERIOLOGICOS PRACTICADOS A LOS PERROS DE LOS LOTES A, B y C, CON UNA INFECCION CRONICA (NO BACTEREMICA), TRATADOS CON OXITETRACICLINA MICRONIZADA INSOLUBLE (OMI)

Lote	No. de perros inoculados	Infección confirmada a la 3a. semana de inoculación		Infección confirmada al final del experimento	
		bacteremia	Títulos serológicos significativos	Aislamiento de B.canis de te- jidos	Títulos serológicos significativos
A (50 mg/semana)	1	+	+	-	-
	2	+	+	-	-
	3	+	+	-	+
	4	+	+	-	-
	5*	-	-	-	-
B (100 mg/semana)	6	+	+	-	-
	7	+	+	-	-
	8	+	+	-	-
	9	+	+	-	-
	10	+	+	-	+
C (sin tratamiento)	11	+	+	+	+
	12	+	+	+	+
	13	+	+	-	+

* No se le administró tratamiento por no confirmarse la infección.

CUADRO No. 8

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICOS Y BACTERIOLOGICOS PRACTICADOS A LOS PERROS DEL LOTE "D", CON UNA INFECCION ACTIVA (BACTEREMICA), QUE RECIBIERON TRATAMIENTO CON OMI-ESTREPTOMICINA.

Tiempo transcurrido después de la inocu- lación	d ₁					d ₂				
	Placa	Aglutinación		Idg* (líneas)	HC**	Placa	Aglutinación		Idg (líneas)	HC
Inoculación	-	-	-	-	-					
3 semanas	200	400	400	2	+	400	400	400	2	+
5 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
12 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
12 - 14 semanas	T R A T A M I E N T O					T R A T A M I E N T O				
4 meses	400	400	400	2	-	400	400	400	2	-
5 meses	200	200	200	1	-	100	100	200	2	-
5 1/2 meses	200	100	100	1	-	50	50	100	-	-
6 meses	100	100	100	2	-	Neg.	Neg.	Neg.	-	-
				difusas						
6 1/2 meses	100	100	100	2	-	Neg.	Neg.	Neg.	-	-
				difusas						
	E u t a n a s i a					E u t a n a s i a				

* Idg Inmunodifusión en gel

** HC Hemocultivo

CUADRO No. 9

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS SEROLOGICOS Y BACTERIOLOGICOS PRACTICADOS A LOS PERROS DEL
LOTE "D" CON UNA INFECCION ACTIVA (BACTEREMICA) QUE RECIBIERON TRATAMIENTO CON OMI

Tiempo transcurrido después de la inocu- lación.	d3					d4				
	P r u e b a s r e a l i z a d a s					P r u e b a s r e a l i z a d a s				
	Placa	Tubo	ME	ldg* (líneas)	HC**	Placa	Tubo	ME	ldg (líneas)	HC
Inoculación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
5 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
12 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
12-14 semanas	T R A T A M I E N T O					T R A T A M I E N T O				
4 meses	400	400	400	2	-	400	400	400	2	-
5 meses	400	400	400	2	-	400	400	400	2	-
	E u t a n a s i a					E u t a n a s i a				

* ldg Inmunodifusión en gel

** HC Hemocultivo

CUADRO No. 10

RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS A LOS PERROS DEL LOTE "E", CON UNA INFECCION ACTIVA (BACTEREMICA) QUE PERMANECIERON COMO CONTROLES

Tiempo transcurrido después de la inocu- lación.	e1					e2				
	P r u e b a s r e a l i z a d a s					P r u e b a s r e a l i z a d a s				
	Placa	Tubo	ME	Idg	HC	Placa	Tubo	ME	Idg	HC
Inoculación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
5 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
12 semanas	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
12 - 14 semanas	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>	<u>NH</u>
4 meses	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
5 meses	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
6 meses	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+
6 1/2 meses	400	400	400	2	+	400	400	400	2	+

Idg Inmunodifusión en gel, No. Líneas.

HC Hemocultivo

NH No hecho

NOTA: Los perros no se sacrificaron puesto que la bacteremia confirmó la existencia de la infección.

CUADRO No. 11

AISLAMIENTO DE BRUCELLA CANIS A PARTIR DE TEJIDOS OBTENIDOS A LA NECROPSIA DE LOS
 PERROS d₁, d₂, d₃ y d₄.

PERRO	d ₁ ♂	d ₂ ♀	d ₃ ♀	d ₄ ♀
Sangre	-	-	-	-
Bazo	+(60 colonias)	-	+(16 colonias)	+(2 colonias)
Ganglios linfáticos:				
retrofaríngeos	+(80 colonias)	-	+(60 colonias)	+(9 colonias)
preescapular	+(60 colonias)	-	+(12 colonias)	-
inguinal	+(12 colonias)	-	+(30 colonias)	-
testículo	+(5 colonias)			
próstata	+(2 colonias)			
médula ósea	Neg.	-	-	-

grupo.

2.- En el lote B, tanto los perros que se inocularon 38 semanas antes de empezar el tratamiento, así como los que tenían 18 meses - de haber sido inoculados, mantenían altos títulos serológicos, los - que empezaron a descender en forma paulatina al iniciarse el tra-
tamiento, hasta la semana 39 en que subieron, pero desde la semana 41 descendieron rápidamente, como se puede apreciar en la gráfica No. 2 que muestra el promedio de la concentración de anti-
cuerpos del lote B. En este grupo el perro No. 10 mantuvo siempre altos títulos serológicos y por eso se le colocó fuera del promedio de la concentración de anticuerpos del lote B.

3.- Los perros del lote Control (C), siempre mantuvieron altos tí-
tulos serológicos, aunque el No. 13 los bajó hasta el nivel límite
considerado como "positivo" como se puede apreciar en la gráfica
No. 3.

B) Resultados de los estudios bacteriológicos de los lotes A, B y C.

1.- Lote A; los perros de este lote se mostraron bactéremicos des-
de la tercera semana de inoculación pero al empezar el tratamiento
38 semanas después de inoculados la bacteremia había cesado, -
manteniéndose así hasta el sacrificio, en ninguno de los animales
de este lote se logró aislar la Brucella canis a partir de muestras
obtenidas a la necropsia (Cuadro 12).

CUADRO No. 12

ASLAMIENTO DE BRUCELLA CANIS A PARTIR DE TEJIDOS OBTENIDOS
A LA NECROPSIA DE LOS LOTES A, B y C.

Semana de Sacrificio Lote	47			48		49			50		51		
	A	B	C	A	B	A	B	C	A	B	A	B	C
Ganglio retrofaríngeo	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ganglio mesentérico	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Bazo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	o
Ganglio prescapular	-	-	+	o	-	-	-	-	-	-	-	-	o
Hemocultivo	-	-	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-
Testículo				-					o			-	
Epidídimo				-					o			-	

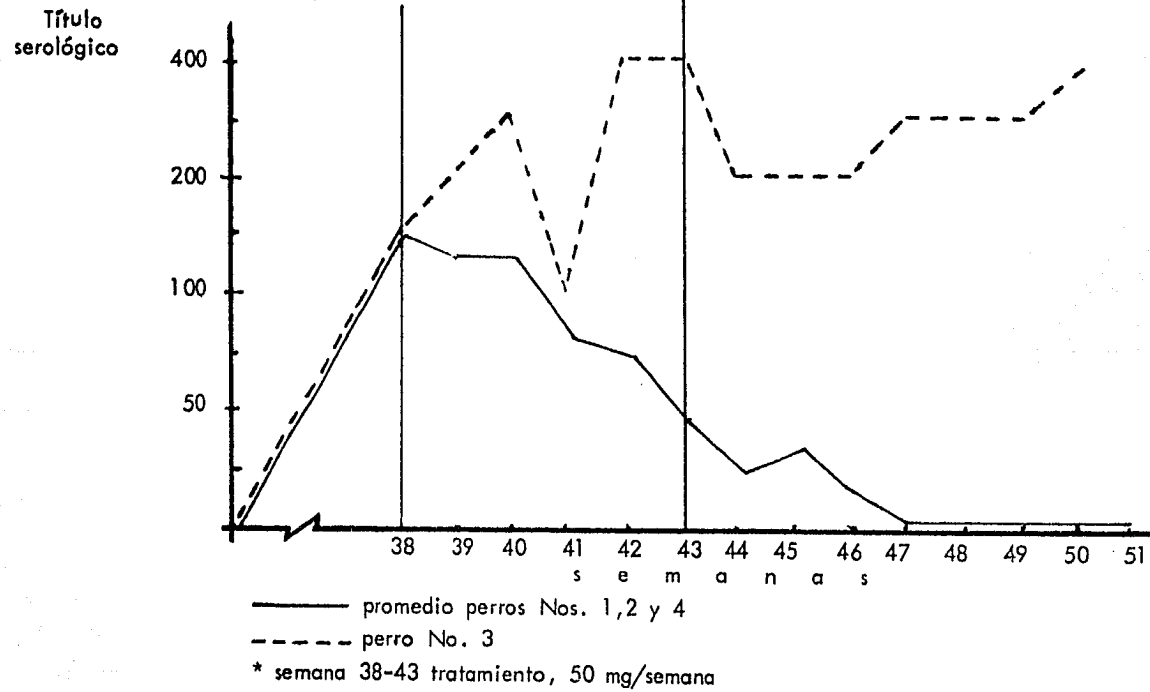
o No hecho

+ Positivo

- Negativo

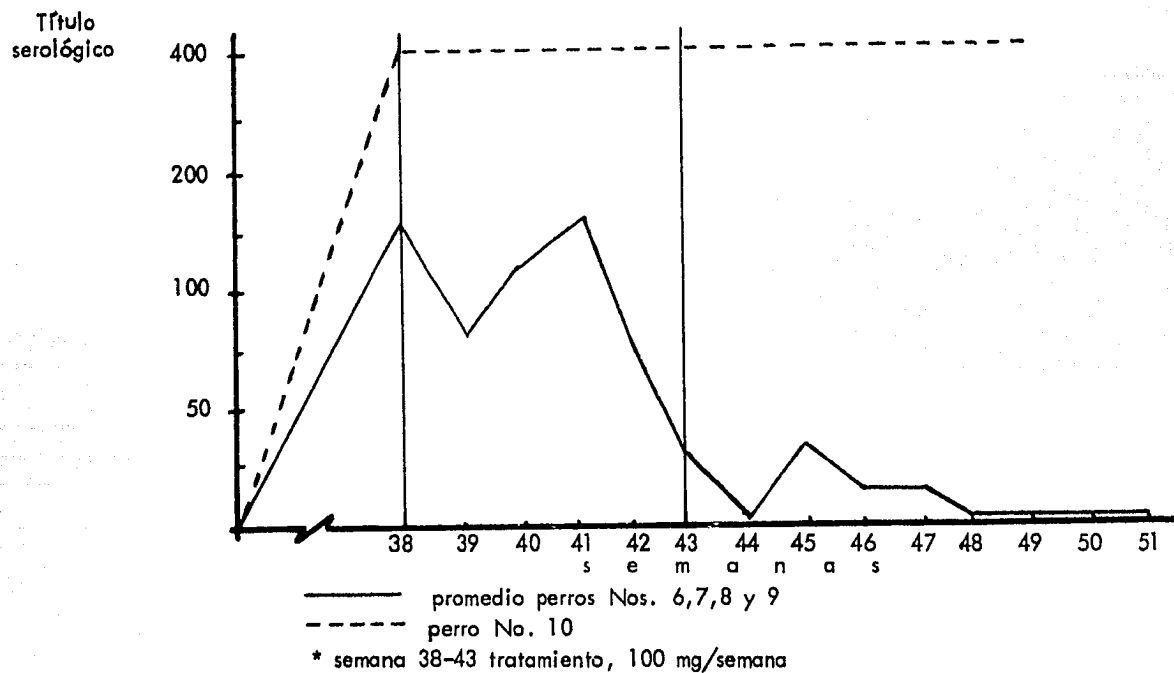
GRAFICA 1

RESPUESTA SEROLOGICA PROMEDIO DEL LOTE A*



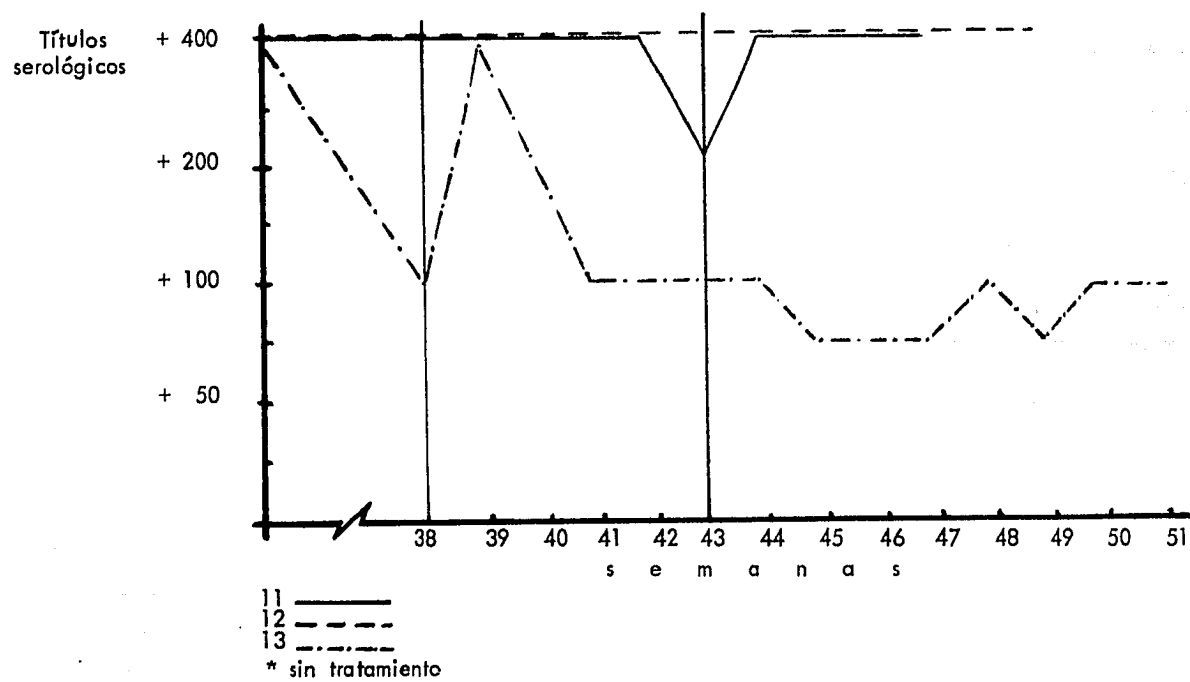
GRAFICA 2

RESPUESTA SEROLOGICA PROMEDIO DEL LOTE B*



GRAFICA 3

TITULOS SEROLOGICOS DEL LOTE CONTROL *



3.- Lote C; en estos perros también se confirmó la infección por me
dios bacteriológicos después de inocularlos, sin embargo a los anima
les a pesar de tener títulos elevados de anticuerpos, no presentaban
bacteremia al momento de iniciar el tratamiento en los lote A y B.
Al final del estudio, dos de ellos resultaron positivos al aislamiento
Brucella canis como se puede observar en el Cuadro No. 12.

C) Resultados de la aplicación de la droga de los lotes A, B y C.

En el lugar de aplicación se observó una zona de inflamación de dos
a tres centímetros de diámetro, que a la palpación era dura, no ad-
herente y edematosa, misma que persistía aproximadamente de 7 a 15
días.

No se observaron signos de intoxicación ni otra reacción en los pe--
rros tratados.

D) Lesiones observadas a la necropsia en los lotes A, B y C.

A la necropsia, los perros 1,2,4,6,7,8 y 9 no mostraron cambios de
los órganos .

El perro No. 3 mostraba aumento de tamaño de los ganglios linfáticos
prescapulares.

El perro No. 10 mostraba linfadenitis, con edema de los ganglios me
sentéricos.

El perro No. 11, linfadenitis generalizada y esplenitis marcada.

El perro No. 12 mostraba ligero aumento de ganglios linfáticos, - los mesentéricos y prescapulares se encontraban edematosos y hemo rrágicos, ligera esplenitis.

El perro No. 13 mostraba ligero aumento de ganglios linfáticos.

E) Resultados serológicos y bacteriológicos de los grupos D y E.

Los cuadros 8,9,10 y 11 presentan en forma breve los resultados obtenidos en los animales d₁, d₂, d₃, y d₄, así como e₁ y e₂. En todos ellos se determinó la presencia de Brucella canis en la sangre desde la tercera semana siguiente a la inoculación experimental. En este tiempo los títulos de anticuerpos séricos fueron por encima de - 1:400 en las pruebas de aglutinación y todos los sueros presentaron - reacciones positivas mediante la prueba de inmunodifusión, produciendo dos líneas de precipitación que fueron de identidad con suero control positivo. Al iniciarse el tratamiento todos los animales presentaron bacteremia, la cual desapareció durante el tratamiento en todos los perros, con excepción de los controles, en los cuales persistió -- hasta el final del estudio.

Los animales d₃ y d₄ en los que se aplicó únicamente OMI, la bacteremia cesó a consecuencia del tratamiento, pero los niveles de anticuerpos no sufrieron cambios.

Ambos fueron sacrificados 5 1/2 meses después de la inoculación experimental (2 meses después de superado el tratamiento). El aislamiento de Brucella canis se logró a partir de bazo y ganglios linfáticos -

de los dos perros, pero el número de colonias fue bajo.

En los perros d₁ y d₂ que recibieron simultáneamente OMI y extrep-tomicina los títulos de anticuerpos disminuyeron como consecuencia - del tratamiento. En uno de ellos (d₁) los niveles más bajos observados fueron 1:100 en las pruebas de aglutinación. Los estudios de inmunodi-fusión en este perro mostraron después de la administración de antibió-ticos solamente una línea muy difusa de precipitación. En el otro ani-mal de este grupo (d₂) los títulos de anticuerpos se redujeron rápida-mente después de la medicación llegando a presentar reacciones abso-lutamente negativas. La eutanasia se practicó en ambos animales 6 1/2 meses después de haber sido infectados experimentalmente (3 meses des-pués de suspender el tratamiento).

El aislamiento de Brucella canis fue posible a partir de muestras de perro d₁, mientras que todos los cultivos practicados con tejidos del - perro d₂ resultaron negativos al aislamiento del germen.

La bacteremia persistió en los dos controles usados en este experimen-to (e1 y e2). Los títulos en estos perros fueron siempre superiores a - 1:400 en las pruebas de aglutinación y además presentaron dos líneas de precipitación cuando se examinaron mediante la prueba de inmu-no-difusión en gel.

F) Resultados del análisis estadístico.

El examen estadístico comparando los resultados del lote A y B contra

los obtenidos en el lote control (C), revelaron diferencia significativa ($p < 0.05$).

El "intervalo de confianza" para estos animales es, con 95% de confianza curarían de 40 a 100 % de los animales tratados y con 99% de confianza curarían 33 a 100% de los animales.

El exámen estadístico comparando los perros tratados números d_1 , d_2 , d_3 y d_4 contra los perros controles números d_5 y d_6 , no revelo diferencias significativas ($p < 0.05$).

IV. DISCUSION

Resultados de publicaciones previas demuestran que la OMI es notablemente efectiva para el tratamiento de brucelosis en humanos debido básicamente a sus características de insolubilidad (41,42,43). Por esta razón se intentó evaluar la acción de esta droga en el tratamiento de la brucelosis canina.

Este antibiótico es una oxitetraciclina precipitada en pH neutro y triturada hasta obtener partículas de 1 a 5 μ , por lo que al ser administrada por vía parenteral estimula su fagocitosis por polimorfonucleares y monocitos, permaneciendo en el citoplasma de estas células por más de 24 horas. En este lapso es transportada a ganglios linfáticos y centro del sistema retículo endotelial, donde se destruyen los leucocitos y se libera la droga; proporcionando una concentración elevada en sitios donde la brucela se encuentra en mayor cantidad, posiblemente en estas áreas es nuevamente fagocitada por las células infectadas, actuando así en dos formas posibles, una intracelular y otra extracelular sobre brucelas liberadas.

Ruiz Castañeda y Col. (40,41,42) recomiendan el uso de este antibiótico no solo en diferentes formas de brucelosis humana, sino también en otras infecciones en las que la inmunidad celular juega un papel importante como es el caso de la osteomielitis. Uno de los problemas más importantes en el tratamiento de la brucelosis en general es la cronicidad

de la infección durante el cual el agente causal se localiza en ciertos tejidos relativamente protegidos de la acción directa de agentes bacterianos. Por esta razón, con el objeto de evaluar la OMI en condiciones similares a las que se producen en casos clínicos, se emplearon para este estudio animales experimentalmente infectados, sufriendo el curso crónico (no bacterémico) de la enfermedad al momento de la terapia.

Además se investigó la actividad del antibiótico en un número reducido de animales con una infección activa (bacterémica).

Los perros Nos. 1,2,3,4,6,7 y 8 que se inocularon junto con el No.5 mostraron a diferencia de éste, bacteremia y altos títulos serológicos a la tercera semana de inoculación y podría indicar que hay perros que son "naturalmente inmunes", la que aún frente a una infección intensa como la de laboratorio, solo desarrollan un bajo título serológico por corto tiempo que después se convierte en negativo. A este perro no se le administró el tratamiento ya que no se le demostró la infección, pero se mantuvo con los perros de su lote para observar si por el contacto con ellos llegaba a infectarse, cosa que no ocurrió.

El perro No. 4 pudiera considerarse como "moderadamente susceptible", en el que la bacteremia permaneció menor tiempo que en los demás, sus títulos serológicos tendían a disminuir y con la aplicación de la OMI bajaron rápidamente.

El resto de los perros (Nos. 9,10,11,12 y 13) se inocularon desde nue

ve meses antes de empezar el tratamiento y forman junto con los otros - perros Nos. 1,2,3,6,7 y 8 otro grupo que se podría llamar "ordinariamente susceptibles", siendo sus características, altos títulos serológicos y bacteremia, la que puede ser intermitente o dejar de presentarse (como sucedió con los perros de este trabajo). Y en un largo tiempo llegar a recuperarse, siendo este el caso del perro No. 13, el cual se encontraba posiblemente en un proceso de localización de la bacteria en ciertos tejidos y debido a eso los títulos serológicos que tenía eran variables pero con tendencia a desaparecer lentamente.

En las gráficas 1 y 2 se puede observar el promedio de la concentración de anticuerpos del lote A y del lote B, respectivamente y al comparárlas se puede apreciar que el lote A mantuvo una disminución franca de los títulos serológicos, que el lote B tardó más tiempo en disminuirlos, - pero lo hizo en forma rápida a partir de la semana 41 y en la semana 43 llegó incluso a niveles más bajos que en el lote A. Esto puede atribuirse a que en el lote B había dos perros que tenían nueve meses más de infectados que los demás perros (salvo 11,12 y 13), por lo que posiblemente - tenían una infección localizada en sitios más inaccesibles para el antibiótico, por lo que todavía a la cuarta semana de tratamiento (semana 41) - la droga no alcanzaba el germen manteniendo el perro No. 9, altos títulos serológicos que hacían más elevado el promedio. Pero de la semana 41 a la 43 los títulos de este perro descienden, posiblemente como consecuencia de la acción del medicamento sobre la Brucella canis.

En las gráficas 1 y 2 no se promediaron los perros números 3 y 10 respectivamente, porque no respondieron a la terapia. El perro No. 3 -- que tenía nueve meses menos de infectado que el perro No. 10, sin embargo, mantuvo variables sus títulos serológicos, mientras que el No. 10 los mantuvo consistentes durante el período de terapia, cosa que podría apoyar lo dicho anteriormente que la Brucella canis se localiza en sitios casi inaccesibles por las drogas y requiere posiblemente mayor tiempo y concentración que los empleados en este trabajo, para su efecto sobre los gérmenes.

Los resultados serológicos del lote control (gráfica 3), mantuvieron siempre a niveles considerados "positivos", el perro No. 13 sin embargo, disminuyó sus títulos a los niveles mínimos que se consideraron como "positivos" en este trabajo.

Los títulos serológicos bajos en los perros números 1,2,4,6,7 y 8 indican que la infección cesa después del tratamiento lo que se comprobó mediante el exámen bacteriológico de las muestras obtenidas a la necropsia, cuyos resultados fueron negativos. No se logró aislar Brucella canis de tres perros a pesar que tenían títulos serológicos significativos que sugieren su persistencia (Nos. 3,10 y 13). Esto puede ser explicado en el perro No. 13 puesto que tenía 22 meses de haber sido infectado y posiblemente el germen se encontraba en proceso de localización en ciertos tejidos estando en pequeñas cantidades en el organismo (no lográndose por ello el aislamiento). Esto explica también el porque sus títulos serológicos estaban descendiendo gradualmente, lo mismo pudo -

haber ocurrido en los perros Nos. 3 y 10, los que mantuvieron a pesar del tratamiento, elevados títulos serológicos. Se puede decir que no -- siempre es posible el aislamiento debido a que no se toma la porción - del tejido de un órgano en el cual esté localizada la infección. Evidentemente en estos animales (Nos. 3 y 10) la antibiótico-terapia produjo una considerable reducción en el número de brucelas.

De los perros controles Nos. 11 y 12, sí se logró el aislamiento del gérmen y ambos tenían títulos elevados, lo que concuerda con resultados - obtenidos por otros autores en los que se observa que a mayor título serológico es mayor la frecuencia de los aislamientos, (7,19).

En contraste con los resultados obtenidos en los grupos A y B, el uso - de la OMI en perros sufriendo una infección activa (bacterémica) produjo la completa eliminación de la infección en uno de los cuatro animales tratados (d₂), el que había recibido además estreptomycina.

En los otros animales tratados con OMI se produjo una notable disminución del número de organismos y la bacteremia cesó inmediatamente después de iniciarse el tratamiento.

Es importante mencionar que la estreptomycina empleada como única - droga en el tratamiento de brucelosis canina produce efectos prácticamente nulos, mientras que aplicada en combinación con otros antibióticos, tales como Minociclina (Lederle), muestra cierto sinergismo (20).

En un estudio reciente, Flores y Carmichael (20) compararon la efectividad de varios antibióticos en diferentes combinaciones así como algunas sulfas, para el tratamiento de la infección experimental por Brucella canis. Los resultados demostraron que dosis elevadas de clorhidrato de tetraciclina (50 mg q.i.d./kg) administradas diariamente durante 15 días resultaron ineficaces para el tratamiento de la enfermedad, aún cuando se aplicaron simultáneamente con otras drogas antibacterianas. Dichos autores observaron que dosis elevadas de Minociclina (50 mg b.i.d./kg), combinadas con 10 mg de estreptomina, durante 15 días, fueron efectivas en la completa eliminación de la infección en 15 de los 18 perros tratados. En contraste dosis reducidas de este antibiótico produjeron resultados poco satisfactorios.

Lo anterior demuestra claramente el valor potencial de la OMI para el tratamiento de brucelosis canina, puesto que en el grupo D en el que un animal se recuperó completamente, la cantidad de la droga administrada a cada perro durante el período de tratamiento fué de 350 mg, equivalente a una sola dosis de clorhidrato de tetraciclina ó minociclina, empleada en el estudio antes citado.

El análisis estadístico revela el potencial terapéutico del medicamento empleado.

V. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

Se concluye que:

a) la oxitetraciclina micronizada insoluble es eficaz para la terapia de perros infectados artificialmente con Brucella canis.

Se sugiere:

a) en base a los resultados obtenidos en los lotes A, B y C, el uso de 100 mg de OMI por perro cada semana durante 6 semanas.

b) continuar investigando el uso de la droga no solo para el tratamiento de brucelosis canina sino que como agente terapéutico en otras infecciones, principalmente aquellos que involucran agentes intracelulares ya que la acción de la OMI es debida posiblemente a su baja solubilidad.

c) que los tratamientos sean acompañados de pruebas serológicas semanales durante el tratamiento y una cada 30 días durante 3 meses para establecer si en realidad la infección fué eliminada.

VI. LITERATURA CITADA

- 1.- Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E., Laboratory Techniques in Brucellosis, p.p. 149, 2nd ed., W.H.O., Geneva. 1975.
- 2.- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed., Williams & Wilkins, Co., Baltimore(USA) 278-282. 1974.
- 3.- Carmichael, L.E., Abortion in 200 Beagles. (News Report), J. Am. - Vet. Med. Assoc. 149: 1126. (1966)
- 4.- Carmichael, L.E., Contagious abortion in Beagles. Hounds and Hunting (USA) 64: 14-18. (1967).
- 5.- Carmichael, L.E., Canine brucellosis: isolation, diagnosis, transmission, Proc. U.S. Livestock San. Assoc., 71: 517-527. (1968).
- 6.- Carmichael, L.E. and Bruner, D.W., Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions, - Cornell Vet., 58: 579-592. (1968).
- 7.- Carmichael, L.E. and Kenney, R.M., Canine abortion caused by *Brucella canis*, J. Am. Vet. Med. Assoc. 152: 605-616. (1968).
- 8.- Carmichael, L.E. and Kenney, R.M., Canine Brucellosis, The clinical disease, pathogenesis, and immune response. J. Am. Vet. Med. Assoc., 156: 1726-1734. (1970).
- 9.- Carmichael, L.E., Canine brucellosis; an annotated review with selected cautionary comments, Theriogenology, 6: 105-116. (1976).
- 10.- Carmichael, L.E. and George, L.W., Canine Brucellosis; newer knowledge, International Symposium on Brucellosis (II), Rabat, Develop. Biol. Standar., (S. Karger, Basel 1976) 31: 237-250 (1975).
- 11.- Center for Disease Control (USA), Human *Brucella canis* infection, Brucellosis surveillance annual summary, 1970, 1971, 1972, 1974.
- 12.- Cowan, S.T. and Steel, K.J., Manual for the identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. Cambridge England. 1974.
- 13.- Deyoe, B.L. (1970). Studies of the pathogenesis of a canine abortion agent (*B. canis*) in dogs and other domestic animals. Mencionado por Car-

- michael, L.E. and George, L.W., Brucellosis newer knowledge. International Symposium on Brucellosis (II), Rabat 1975. Develop. Biol. Standard. (S. Karger, Basel, 1976). 31: 237-250 (1970).
- 14.- Diaz, R., Jones, L.M. and Wilson, J.B., Antigenic Relationship of the Gramnegative Organism Causing Canine Abortion to Smooth and Rough Brucellae. J. Bacteriol. 95: 618-624 (1968).
- 15.- Diaz, R., and Bosseray, N., Identification d'un compose antigenique specifique de la phase rugueuse (R) des brucella, Ann. Rech. Vet., 4: 283-292. (1973).
- 16.- Englehardt, C.E.M., (1974), Incidencia de Brucella canis en perros en el Distrito de Chiclayo, Mencionado por Carmichael, L.E., en Canine brucellosis an annotated review with selected cautionary comments Theriogenology, 6: 105-116. (1976).
- 17.- Flores, C.R., Segura, R.L., Estudio sobre Brucella canis en México, Técnica Pecuaria en México, 29: 54. (1975).
- 18.- Flores, C.R. y Segura, R.A., Serological and bacteriological survey of canine brucellosis in México, Cornell Vet. 66: 347-352. (1975).
- 19.- Flores, C.R., Suárez-Güemes, F., Ramírez-Pfeiffer, C., and Carmichael, L.E., Canine Brucellosis: A bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City, J. Clin. Microbiol. 6: 591-597. (1977).
- 20.- Flores, C.R. and Carmichael, L.E., Canine brucellosis: Current Status of Methods for Diagnosis and Treatment. Procc. 27th. Gaines Veterinary Symposium. Texas A/and M. Univ.: 17-24. (1977).
- 21.- George, L.W. and Carmichael, L.E., A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis, Am.J. Vet. Res., 35: 905-909. (1974).
- 22.- Godoy, A.M.(1974), Brucella canis in Brazil. Mencionado por Carmichael, L.E., en "Canine Brucellosis: Newer knowledge" International Symposium on Brucellosis (II) Rabat, Develop. Biol. Standar. 31: 237-250 (S. Karger, Basel 1976). (1975).
- 23.- Henderson, R.A., Horlein, B.F., Kramer, T.T. and Meyer, M.E., Discompendylitis in three dogs infected with Brucella canis, J.Am.Vet.Med.Assoc. 165: 451-455. (1974).
- 24.- Hoff, G.L. y Col. (1974), Survey of Selected Carnivore and Opossum Serums for Agglutinins to Brucella canis. Mencionado por Carmichael, L.E., - en Canine brucellosis: An annotated review with selected cautionary comments, Theriogenology, 6: 106-116. (1976).

- 25.- Hoyer, B.H. and Mc Cullough, N.B., Homologies of Deoxyribonucleic acids from Brucella ovis, canine abortion organisms, and other Brucella species, J. Bacteriol. 96: 1783-1790. (1968).
- 26.- Jennings, P.B., Crumrine, M.H., Lewis, G.E., Jr. and Fariss, B.L., The effect of a two stage antibiotic regimen on dogs infected with Brucella canis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 164: 513-514. (1974).
- 27.- Jones, L.M., Zanardi, M., Leong, D. and Wilson, J.B., Taxonomic position in the genus Brucella of the causative agent of canine abortion J. Bacteriol. 95: 625-630. (1968).
- 28.- Lewis, G.E., A serological survey of 650 dogs to detect titers for Brucella canis (Brucella suis, type 5), J.Am.Anim.Hosp.Assoc. 8:102-107 (1972).
- 29.- Lewis, G.E., Canine brucellosis, en: Current Veterinary Therapy. V.- Small Animal Practice, p. 974-976. R.W. Kirk (ed) Philadelphia, W. - B. Saunders. 1974.
- 30.- Lewis, G.E., Jr., Cumrine, M.H., Jennings, P.B. and Fariss, B.L., - Therapeutic value of tetracycline and ampicillin in dogs infected with - Brucella canis, J. Am. Vet. Med. Assoc. 163: 239-241. (1973).
- 31.- Mc. Williams, E.C., (1974), Incidencia de Brucella canis en perros del Distrito de Chiclayo. Citado por Segura, L.R., En estudio Bacteriológico y Serológico de Brucella canis en perros del Distrito Federal. Tesis - UNAM, México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (1976).
- 32.- Meyer, M.E., Brucella organism isolated from dogs; Comparison of characteristics of members of the genus Brucella, Am. J. Vet. Res., 30: 1751-1756. (1969).
- 33.- Moore, J.A., Benet, T.J., A previously undescribed organism associated with Canine abortion. Vet. Rec. 80: 604-605. (1967).
- 34.- Moore, J.A., Brucella canis infection in dogs, J.Am.Vet.Med.Assoc. -- 155: 2034-2037. (1969).
- 35.- Moore, J.A. and Kakuk, T.J., Male dogs naturally infected with Brucella canis, J. Am.Vet.Med.Assoc. 155:1352-1358. (1969).
- 36.- Morris, J.A., The use of Polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of Brucella. J. Gen. Microb. 76: 231-237. (1973).
- 37.- Morrisset, R. and Spink, W.W., Epidemic canine brucellosis due to a new species, Brucella canis, Lancet 2: 1000-1002. (1969).

- 38.- Pickerill, P.A., (1970), Canine brucellosis: Serological, Host Range, and Epidemiological studies. Mencionado por Segura-López R., en - Estudio Bacteriológico y Serológico de Brucella canis en perros del Distrito Federal, Tesis de Licenciatura. UNAM, México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (1976).
- 39.- Pickerill, P.A., Comments in Epizootiology and control of canine Brucellosis, Am. Vet. Med. Assoc. 156: 1741-1742. (1970).
- 40.- Pickerill, P.A. and Carmichael, L.E., Canine Brucellosis; control programs in commercial kennels and effect on reproduction, J. Am. Vet. Med. Assoc. 160: 1607-1615. (1972).
- 41.- Reike, J.A. and Rhoades, H.E., (1975), Brucella canis Isolated from - the Eye of a Dog. Mencionado por Carmichael, L.E., en Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. Theriogenology, 6: 105-116. (1976).
- 42.- Ruiz-Castañeda, M., Chemotherapy of Brucellosis Bull. Wld. Hlth. Org., 16: 443-446. (1957).
- 43.- Ruiz-Castañeda, M. y Corvera, M.A., Notas sobre terapéutica de la - brucelosis. Separata de Anales de la Facultad de Medicina, Tomo XLII No. 1-Lima- 69-82. (1959).
- 44.- Ruiz-Castañeda, M., Papel de los fagocitos en el tratamiento con terramicina micronizada (Insoluble) Bol. Med. Hosp. Infant. 30: 529-534. (1973).
- 45.- Segura, R.L., Estudio Bacteriológico y Serológico de Brucella canis en - perros del Distrito Federal. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. (1976).
- 46.- Spink, W.W., Comments on canine brucellosis due to Brucella canis, J. Am. Vet. Med. Assoc. 156: 1734-1736. (1970).
- 47.- Snedek, W.G., and Cochran, G.W., Statistical Methods (6th ed). The - Iowa State University, Press. 1974.
- 48.- Swenson, R.M., Carmichael, L.E. and Cundy K.P., Human infection with Brucella canis, Annals. Int. Med., 76: 435-438. (1972).
- 49.- Taul, L.K., Powell, H.S., and Baker, O.E., Canine abortion due to an unclassified Gram-negative bacterium, Vet. Med./Sm. Anim. Clin., 62: 543-544. (1967).
- 50.- Von Kruedener, R.B., Outbreak of Brucella canis in a Beagle colony. Brucellosis 2. Symposium International de Rabat. (1975).

- 51.- Weber, A. and Hussein, N.A., Der indirekte Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Brucella-canis-infektionen bei Beagle-Hunden, Zbl.Vet. Med., 23: 151-154. (1976).
- 52.- Weber, V.A., and Krauss, H., Über die Brauchbarkeit des Agargel-Prazipitationstestes zum nachweis von Brucella-canis-infektionen bei Beagle-Hunden, Berl. Munch. Tierarztl. Wschr., 88: 425-427. (1975).
- 53.- Yamauchi, C., Suzuki, T. y Nomura, T., Canine brucellosis in a beagle breeding colony. Japan. J.Vet.Sci. 36: 175-182. (1974).