

01674
12

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

SEROPREVALENCIA DE ANTÍGENOS LISOS Y RUGOSOS
DE *BRUCELLA* EN CANINOS

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA
TOMÁS HERNÁNDEZ GÓMEZ

TUTOR
JORGE TÓRTORA PÉREZ

COMITÉ TUTORAL
EFRÉN DÍAZ APARICIO
FELICIANO MILIAN SUAZO

COLABORADOR INVITADO
GUILLERMO VALDIVIA ANDA

Cuautitlán, México.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTO

**Este trabajo se realizó con el
financiamiento del proyecto:
Cátedra de Investigación
“Mecanismos de Patogenicidad
Microbianos” (Clave 5.21).**

13

RESUMEN

El género *Brucella* presenta dos formas antigénicas principales: especies lisas (L) y rugosas (R). Las especies lisas pueden infectar mamíferos domésticos, salvajes y al hombre, provocando cuantiosas pérdidas económicas. En México las condiciones deficientes de manejo y medicina preventiva representan un alto riesgo para la diseminación de la enfermedad. El aborto y las estructuras que se eliminan con el contienen una gran cantidad de bacterias, existe la posibilidad de que estas sean trasladadas e ingeridas por el perro, convirtiéndolo en un factor de diseminación de la enfermedad. En el presente trabajo se analizó la seroprevalencia en perros a antígenos lisos y rugosos de *Brucella*, se tomaron muestras de sangre a perros de diferente hábitat (urbanos, semiurbanos y rurales), identificados por una ficha de registro, la cual contenía otras variables para ser analizadas. Los sueros se sometieron a la prueba de aglutinación en placa con antígeno liso y rugoso, los positivos fueron sometidos adicionalmente a la prueba de aglutinación en placa adicionando mercaptoetanol, con el suero a diferentes diluciones para establecer el título de anticuerpos. Con la prueba de Western Blot y usando antígenos de *Brucella canis* y *Brucella abortus* se determinó que proteínas fueron reconocidas por los sueros caninos. La seroprevalencia para brucelas rugosas fue mayor en los perros suburbanos ($p < 0.000124$) y para brucelas lisas fue mayor en los perros rurales ($p < 0.000001$). Las proteínas 18 kDa y 31 kDa solo presentes en *B. canis* fueron fuertemente reconocidas, la proteína 48 kDa, aunque presente en ambas brucelas, solo fue reconocida por los perros positivos a brucelas lisas. El nicho ecológico de origen de los perros influyó en la seroprevalencia a antígenos lisos y rugosos. El perro debe ser considerado en la epidemiología de la enfermedad en las especies ganaderas

Palabras clave: *Brucella abortus*, *Brucella canis*, nicho ecológico.

ABSTRACT

The *Brucella* genus presents two antigenic principal forms: smooth species (S) and rough (R). The smooth species can infect domestic, wild mammals and man, producing many economic losses. In México the deficient management conditions and preventive medicine represent a high risk for the dissemination of the disease. The abortion and the structures that are eliminated with it contain a great amount of bacteria, existing the possibility that these could be translated and eaten by the dog, converting it in a factor of dissemination of the illness. In this work it was analyzed the seroprevalence in dogs to smooth and rough *Brucella* antigens, it was taken blood samples to different dogs from different habitat (urban, semiurban and rural), identified by a record card, which contains other variables in order to be analysed. The serum was subject of an agglutination test on plate with smooth and rough antigen, the positives were subject again to the agglutination test on plate adding mercaptoetanol, with the serum to different dilutions to establish the antibody titer. With the Western Blot test and using *Brucella canis* and *Brucella abortus* antigen it was determined that proteins were recognized by the canine serum. The seroprevalence for rough brucellas was higher in semiurban dogs ($p < 0.000124$) and for smooth brucellas was higher in rural dogs ($p < 0.000001$). The 18 kDa and 31 kDa proteins only present in *B. canis* were strongly recognized, the 48 kDa protein, even though present in both *Brucella*, it was only recognized by the positive dogs to smooth *Brucella*. The original ecological habitat of the dogs influenced in the seroprevalence to smooth and rough antigens. The dog must be considered in the epidemiology of the disease in the live stock species.

Keyword: *Brucella canis*, *Brucella abortus*, habitat.

INDICE

1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	5
Características bacteriológicas del género <i>Brucella</i>	8
Propiedades antigénicas	9
Epizootiología y epidemiología	13
Patógena y cuadro clínico	14
3.- Justificación	16
4.- Hipótesis	17
5.- Objetivo	17
6.- Material y métodos	18
Establecimiento de los diferentes grupos	19
Ficha de registro	20
Toma de muestras	21
Antígenos bacterianos	21
Prueba de aglutinación en placa	21
Prueba de 2 mercapto-etanol	22
Cepas bacterianas	22
Obtención de proteínas bacterianas	22
Prueba de inmunotransferencia (Western Blot)	23
Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) ...	24
Preparación de los geles (PAGE-SDS) y corrimiento electroforético	24
Tinción de los geles de poliacrilamida	25
Inmunotransferencia	25
Inmunoblots	26
Análisis estadístico	26

7.- Resultados	27
Grupos poblacionales	27
Determinación y comparación de la seroprevalencia en los diferentes grupos	28
Prueba de aglutinación en placa	28
Prueba con 2 mercapto etanol	29
Nicho ecológico (grupo poblacional) como factor de riesgo	32
Tipo de alimento como factor de riesgo	33
Proteínas reconocidas en la prueba de Inmunotransferencia	34
8.- Discusión	38
9.- Conclusiones	46
9.- Bibliografía	47

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis de importancia mundial. Es una enfermedad provocada por diversas especies de bacterias pertenecientes al género *Brucella*, las cuales producen una infección intracelular en bovinos, ovinos, caprinos, suinos, caninos y otros mamíferos silvestres, produciendo principalmente abortos y pérdidas económicas cuantiosas, ya que afecta la reproducción y la productividad de los animales. Es también un problema de Salud Pública ya que el ser humano es susceptible de adquirir la enfermedad, sufriendo infecciones crónicas tales como endocarditis, artritis y osteomielitis (Cheri y Walker, 1992; Enright, 1990; Orduña *et al.*, 1994 y Stevens *et al.*, 1994).

El género *Brucella* presenta dos formas antigénicas principales: brucelas lisas (L) y brucelas rugosas (R). De las cuales se reconocen seis especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*. Son reconocidas siete biovariedades para *B. abortus*, cinco para *B. suis* y tres para *B. melitensis* (Corbel *et al.*, 1984; Verger *et al.*, 1985). A las brucelas lisas pertenecen *B. abortus* que afecta principalmente al ganado bovino, *B. melitensis* al ganado ovi-caprino, *B. suis* a los cerdos y finalmente *B. neotomae* a la rata del desierto. A las brucelas rugosas pertenecen *B. ovis* que afecta al ganado ovino y *B. canis* a los caninos.

El humano adquiere la brucelosis de los animales y no de otras personas. La infección puede adquirirse por manipulación de objetos contaminados, por secreciones o bien por el manejo de tejidos, sangre, orina, descargas vaginales, fetos abortados y placentas de animales infectados. El consumo de leche cruda y los productos derivados de esta pueden también conducir a la infección (Ruiz, 1986).

La infección por *Brucella canis* en perros adultos está caracterizada por unos cuantos signos clínicos: linfoadenopatía transitoria, rara vez fiebre, aborto entre los días 45 y 59 de la gestación, epididimitis, infertilidad, anormalidades en el semen o atrofia testicular. Aunado a esto, la confirmación del diagnóstico clínico no siempre es sencilla, los resultados de la biometría hemática, perfil bioquímico y urianálisis usualmente no se encuentran alterados a pesar de existir una infección sistémica generalizada, por lo tanto se tiene que recurrir a otras pruebas que ayuden a corroborar el diagnóstico.

Las pruebas que mejor pueden ayudar en el diagnóstico de brucelosis en perros son la demostración de anticuerpos contra *Brucella canis*; así como el aislamiento de la bacteria de los animales infectados. Las pruebas serológicas, dado la facilidad de conseguirlas comercialmente, son probablemente las más comúnmente usadas como pruebas diagnósticas. Las ventajas de éstas sobre el aislamiento bacteriano son la rapidez y facilidad con que la mayoría de ellas pueden ser efectuadas. La desventaja, es que no son totalmente específicas para *Brucella* y pueden dar resultados falsos positivos. Por su parte los cultivos bacterianos, aunque proveen un diagnóstico definitivo, son tardados y pueden llegar a dar resultados falsos negativos.

Una vez infectado el animal, la diseminación hematológica hacia otros órganos provoca una bacteremia que puede ser detectada entre la segunda y cuarta semana post-infección y puede persistir de 6 a 64 meses. Las pruebas serológicas son poco sensibles durante las primeras cuatro semanas de la infección. Los anticuerpos del tipo IgM, una molécula pentamérica que se encuentra en el suero, se producen como una respuesta temprana contra los antígenos proteicos y el lipopolisacárido (LPS); y pueden ser detectados entre las 8 y 12 semanas post-infección, los títulos de estos anticuerpos generalmente permanecen altos (1:400 a 1:3200) mientras persiste la bacteremia, cuando esta se vuelve intermitente o disminuye, los títulos de anticuerpos declinan (1:50 a 1:200) y pueden dar lugar a equivocaciones o resultados negativos; sin embargo, la bacteria

persiste en tejidos infectados. En algunos animales estas fluctuaciones en los títulos pueden darse aún en presencia o ausencia de bacteremia. Desafortunadamente los antígenos de la pared celular de *Brucella canis* no son únicos para estos organismos, se han reportado reacciones cruzadas con *B. ovis*, *B. abortus*, cepas mucoides de *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus*, *Bordetella bronchiseptica*, así como bacterias del género *Salmonella*, *Yersinia* y *Proteus*, generando resultados falsos-positivos (Cheri y Walker, 1992; Cloeckaert et al., 1993; Díaz *et al.*, 2000).

La infección en los perros por *B. canis*, ocurre a través de las membrana mucosas oral, nasal, conjuntival y genital, la ruta oral es considerada la más común. La dosis mínima infectante oral es alrededor de 10^6 , mientras que la dosis mínima conjuntival es de 10^4 a 10^5 organismos, un canino infectado puede eliminar en las estructuras abortadas y las descargas vulvares post-aborto hasta 10^{10} organismos por mililitro y en la orina de 10^3 a 10^6 organismos por mililitro y puede estarlos eliminando desde la octava semana hasta las treinta semanas después de la infección (Cheri y Walker, 1992).

Las bacterias lisas del género *Brucella* pueden infectar a un amplio rango de mamíferos domésticos y salvajes (Cloeckaert et al., 1993 y Enright, 1990). En países de recursos agrícolas y ganaderos limitados, como en el caso de México, la cabra y el borrego constituyen fuentes de explotación barata y fácil, así mismo persisten zonas de explotación de ganado bovino, así como la existencia de rebaños campesinos donde conviven muy diversas especies (solípedos, rumiantes, cerdos, perros), en donde las condiciones de manejo y medicina preventiva son muy deficientes dando como resultado, en el caso de la brucelosis, un alto índice de riesgo para la diseminación de la enfermedad, siendo finalmente la infección al ser humano la de mayor importancia, sin menospreciar las cuantiosas pérdidas económicas que representa en las especies de animales.

En los animales en que se presenta el aborto, el feto y los fluidos que se eliminan con este, contienen gran cantidad de brucelas representando una fuente de contaminación del medio ambiente y de contagio para otros animales. Aquí el perro juega un papel importante, al igual que otros animales silvestres, ya que existe la posibilidad de que el feto y la placenta sean acarreados e ingeridos por éste convirtiéndose en ese momento en un vector que disemine la enfermedad (Enright, 1990, Palmer *et al.*, 1996). Las zonas más afectadas por esta diseminación e infección son las rurales, pero comparten la infección con las urbanas ya sea por conducto de productos lácteos frescos de consumo rápido o que puede estar dado por el deambular de esos perros infectados hacia zonas semirurales o semiurbanas. Por estas razones, y en el caso particular del perro, como especie susceptible, es importante establecer si éste es capaz de actuar como vehículo para la diseminación de la enfermedad.

ANTECEDENTES

A nivel mundial existen diferentes estudios que demuestran la seroprevalencia de brucelosis en perros, tanto de brucelas lisas como de brucelas rugosas (Katami *et al.*, 1991; Mateu y Martín, 1993), así como la posibilidad de que el perro desarrolle la infección por inoculación experimental (Davis *et al.*, 1988; Palmer y Cheville, 1997; Srinivasan y Venkataraman, 1992).

El tipo de diagnóstico que generalmente se realiza es serológico con prueba de aglutinación en placa, ya que se ha reportado posee buena especificidad y sensibilidad (Alton *et al.*, 1988; Baldi *et al.*, 1997; Cheri y Walker, 1992; Díaz *et al.*, 2000; Mateu y Martín, 1993; Mateu y Martín, 1994; Neculescu *et al.*, 1995 y Ruiz, 1986).

Estudios serológicos en perros para detectar enfermedades zoonóticas, entre las cuales se incluye brucelosis, realizadas en países como China, Pakistán, India y Brasil arrojan resultados positivos que varían del 2.8% hasta el 9.3% (Ahmad y Munir, 1995; Feitosa *et al.*, 1991; Germano *et al.*, 1987; Liu-Dao Xin *et al.*, 1996; Taylor y Perdue, 1989; Thanappa *et al.*, 1990). En Estados Unidos de 331 casos de brucelosis en humanos cuatro resultaron positivos a *Brucella canis* (Taylor y Perdue, 1989). En Brasil de 3385 perros callejeros capturados en diferentes partes de la ciudad de Sao Paulo el 7.5% de ellos fueron positivos a *Brucella canis* (Cortes, 1988). En Argentina de 199 perros seleccionados de 161 granjas, el 16.2% fueron positivos a pruebas de brucelosis (Delgado y Centorbi, 1990), en la India se recolectaron 460 muestras de perros pertenecientes al área urbana, resultando positivos a *Brucella canis* el 4%, de igual forma en el área rural fueron recolectadas 261 muestras de las cuales el 3.1% resultó positiva a *Brucella canis* y el 2.7% positivas a *Brucella abortus* (Srinivasan *et al.*, 1992). Así mismo infecciones experimentales realizadas en Estados Unidos en perros, perras gestantes y no gestantes, inoculados por vía oral e intravenosa con la cepa vacunal RB 51 de *Brucella abortus*, se

lograron evidencias de infección. La bacteria fue aislada de los linfonodos retrofaríngeos de todos los perros inoculados oralmente, una de estas gestante, también presentó placentitis aunque no hubo infección en el feto. En las hembras gestantes inoculadas intravenosamente la bacteria causó placentitis e infección fetal, esto sugiere que las membranas placentarias infectadas, así como los fluidos pueden ser una ruta de infección para otros animales (Palmer y Cheville, 1997). En la India de quince perros inoculados en forma experimental con *Brucella abortus* el 100% resultaron seropositivos al séptimo día postinoculación (Srinivasan *et al.*, 1992). En un estudio llevado a cabo en coyotes, los cuales fueron alimentados individualmente con tejido placentario bovino macerado e inoculado experimentalmente con la cepa 2308 de *Brucella abortus* y posteriormente puestos en contacto con novillas Hereford gestantes, no vacunadas con *Brucella abortus* y seronegativas a *Brucella spp.*, tres de las novillas resultaron seroreactivas 14 días después de la exposición a los coyotes infectados, las cuales abortaron en los días 35, 64 y 66 postexposición y de las que se aisló, en las secreciones vaginales, leche, tejidos placentarios y tejidos fetales, la cepa antes mencionada, lo que sugiere la posibilidad de que los cánidos diseminen la enfermedad (Davis *et al.*, 1988).

Estudios serológicos realizados en diferentes países, España, India, Japón, Brasil y Argentina, en la población de perros callejeros y aquellos que viven en el medio rural arrojan resultados positivos tanto para brucelas lisas como rugosas (Cortes *et al.*, 1988; Delgado y Centorbi, 1990; Katami *et al.*, 1991; Mateu y Martín, 1993; Thanappa *et al.*, 1990). En España se muestrearon 346 perros callejeros y 302 perros caseros, el 15.2% de los callejeros y el 4.6% de los caseros fueron positivos a *Brucella canis*, así como el 9.2% de los perros callejeros y el 2.0% de los perros caseros resultaron positivos a *Brucella abortus* (Mateu y Martín, 1993).

Lo anterior adquiere primordial importancia ya que las brucelas lisas y las especies que afectan, así como los tipos de explotaciones utilizadas en éstas, representan

probablemente un mayor riesgo de infección, dado el pobre control que en ocasiones se tiene en dichos lugares y el hecho de que en muchos de estos, se utilizan perros que colaboran en las tareas de pastoreo que a su vez son susceptibles de infectarse y diseminar la infección. Las pruebas realizadas en Irán, Portugal, Polonia, Cataluña, India, Italia, China, Canadá y Francia, demuestran la presencia de brucelas lisas en los perros utilizados con los propósitos antes mencionados (Forbes, 1990; Galiero *et al.*, 1991; Garin *et al.*, 1988; Kopczewski *et al.*, 1995; Mateu y Martín, 1993; Medeiros, 1995; Reeves *et al.*, 1996; Talebkan *et al.*, 1997 y Tian *et al.*, 1990).

En Canadá, 14 perros obtenidos de 10 granjas diferentes con bovinos infectados por brucelosis, fueron encontrados positivos al cultivo postmortem con *Brucella abortus*, los órganos seleccionados para su aislamiento fueron, hígado, bazo, órganos genitales y linfonodos mandibulares, retrofaringeos, traqueobronquiales y mesentéricos (Forbes, 1990).

En Francia, en una región con baja prevalencia de la enfermedad, dos brotes de brucelosis con aborto, se presentaron en el mismo hato con tres años de diferencia, en el primer brote el perro guardián de la granja mostró bajos títulos de aglutinación positiva, sin embargo en el segundo brote estos títulos se incrementaron ocho veces, el perro se sacrificó y de los linfonodos mesentéricos fue aislada *Brucella abortus* biovariedad 1 la cual también fue aislada del ganado en el segundo brote, lo que sugiere que el perro actuó como reservorio de la infección entre los dos brotes (Garin-Bastuji *et al.*, 1988).

En Portugal, se examinaron sueros de 89 perros de 49 granjas de bovinos, para brucelosis, el 28% resultó positivo al antígeno liso, concluyéndose que la ingestión de leche y placentas infectadas por la bacteria fueron el probable origen de la respuesta, convirtiendo a los perros en una fuente potencial de infección para el ganado (Medeiros, 1995). En Irán se analizaron sueros de cien perros pastores para detectar antígenos lisos, 37 muestras resultaron

positivas (Talebkhani *et al.*, 1997). En China se realizaron pruebas a 245 perros de origen rural detectándose el 6.1% positivos a *Brucella abortus* (Tian *et al.*, 1990).

Características Bacteriológicas del género *Brucella*

Las bacterias del género *Brucella* son bacterias Gram-negativas de forma cocobacilar, inmóviles, no esporuladas y que no presentan cápsula evidente. Tienen la particularidad de ser intracelulares facultativas capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema retículo endotelial y tejidos asociados, motivo por el cual el tratamiento con antibióticos no elimina al microorganismo, provocando que los animales permanezcan infectados, y que la enfermedad evolucione hacia formas crónicas. Las especies del género *Brucella* presentan dos formas antigénicas principales, brucelas lisas (L) y brucelas rugosas (R), existen cuatro especies, *B. abortus*, *B. mellitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* que presentan características de superficie propias del fenotipo liso, con presencia de lipopolisacárido con cadena O, pero se encuentran dos especies que carecen del lipopolisacárido liso, por la ausencia de la cadena O, que se parecen a las mutantes rugosas de las especies lisas, denominándose especies rugosas. *B. ovis* y *B. canis* (Cheri y Walker, 1992; Enright, 1990; Nicolitti, 1991; Orduña *et al.*, 1994; Ruiz, 1986; Sangari y Agüero, 1996; Stevens, 1994). Las brucelas son organismos aerobios que requieren de medios enriquecidos para su aislamiento primario; además, *B. abortus* y *B. ovis* usualmente requieren de una atmósfera con tensión de dióxido de carbono incrementada. Las seis especies reconocidas, pueden ser diferenciadas sobre la base de los requerimientos de CO₂, producción de H₂S, susceptibilidad a los fagos, antígenos de superficie celular y sensibilidad a diferentes colorantes (Enright, 1990).

Propiedades Antigénicas

Las bacterias del género *Brucella* se caracterizan por tener una pared celular compuesta por una membrana interna y una externa, pared celular y un espacio periplásmico intermedio. Este último contiene un glucopéptido (mureína o peptidoglicano) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria; así como también enzimas, entre ellas muchas que detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes y varias enzimas sobre las que actúan los antibióticos β -lactámicos. La pared celular de *Brucella* esta constituida por la capa de peptidoglicano fuertemente asociada con la membrana externa, ésta última contiene, distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS). En aquellas bacterias Gram negativas que carecen de cápsula, el antígeno inmunodominante de la superficie celular es el LPS, que consta de una parte más interna glucolípídica (lípidio A), unida a la membrana externa, y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior (Lugtemberg y Van Alphen, 1983). Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, también conocido como CORE, más interno, formado por azúcares y derivados de azúcares y la cadena O formada por polisacáridos. Las especies rugosas, *B. ovis* y *B. canis* en forma natural carecen de la cadena O, que poseen las especies lisas *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*, aunque pueden perderla por mutación, denominándose mutantes rugosas. Esta diferencia es importante ya que las brucellas habitualmente patógenas para el hombre (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) poseen LPS en fase lisa y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica (Cloekaert, 1993; Enright, 1990; Reeves *et al.*, 1996; Stevens, 1994).

El lípidio A de *Brucella* no parece tener relevancia diagnóstica como antígeno y es químicamente diferente al de las bacterias Gram negativas clásicas. Dicho lípidio está

formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β - hidroxiaácidos y otros ácidos grasos de cadena larga. Debido a ésta diferencia en su composición, algunas de las características de los LPS relacionadas con la endotoxicidad, como la pirogenicidad, son diferentes en *Brucella*, lo que podría tener importancia en la patogénesis (Díaz *et al.*, 2000).

Del núcleo o Core del LPS, aunque no se conoce en detalle su estructura, se sabe que contiene 2 ceto, 3-deoxioctulosonato (Kdo), glucosa, galactosa y quinovosamina, y que carece de heptosa. En otras bacterias Gram negativas el núcleo y el lípido A del LPS son las que juegan un papel crítico en la impermeabilidad frente a agentes hidrófobos. El LPS de *Brucella* es diferente a este nivel, ya que no actúa como tal (Díaz *et al.*, 2000).

La cadena O (polisacárido O) está formado por un solo tipo de azúcar, la N-formil perosamina sin ramificaciones, y contiene los epitopes relevantes en el diagnóstico serológico realizado con las pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-L (todas aquellas que emplean suspensiones celulares o extractos que contienen LPS-L). Los enlaces encontrados en este azúcar dan lugar a ciertas diferencias en el biotipo 1 de *B. abortus* el único enlace es el α 1,2 por lo tanto hay trechos de más de cinco azúcares con el mismo enlace, en *B. melitensis* biotipo 1 por cada cuatro enlaces α 1,2 hay un enlace α 1,3, el cual esta ausente en el biotipo de *B. abortus*. Esto da lugar a tres tipos básicos de epitopes: el A o *abortus* (cinco o más azúcares en α 1,2); el M o *melitensis* (que contiene el enlace α 1,3), y el C o común (cuatro o menos azúcares con enlaces α 1,2). Por tanto, el esquema clásico de Wilson y Miles, según el cual hay sólo los epitopes A y M en distintas proporciones en *B. abortus* (Am o A>M) y *B. melitensis* (aM o A<M), se sustituye por otro en el que *B. abortus* y *B. melitensis* del biotipo 1 serían AC y MC, respectivamente. Existen biotipos de *B. abortus* serológicamente MC, y el biotipo 3 de *B. melitensis* es intermedio (AMC) y sus cadenas O poseen enlaces α 1,3 o proporciones

intermedias de enlaces α 1,2 y α 1,3 , respectivamente (Cloekaert et al., 1993; Sangari y Agüero 1996; Díaz *et al.*, 2000).

Aunque estos datos son útiles para entender la serotipificación de las brucellas L, la generalidad de los anticuerpos producidos en la infección reconocen el epitopo C. Además, es importante entender que estos epitopos no son, a efectos prácticos, entidades discretas, ya que en una respuesta policlonal se producen anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con varios de ellos, si bien con diferentes afinidades. En suma, esta circunstancia explica el porque en el diagnóstico serológico es irrelevante el origen (*abortus o melitensis*) del antígeno (suspensión celular o LPS-L) y no es posible distinguir el serotipo (AC, MC o AMC) infectante (Díaz *et al.*, 2000).

Existen varias bacterias Gram negativas que poseen también derivados de la perosamina en su LPS y pueden dar respuestas cruzadas con *Brucella*, (*Yersinia enterocolitica* serotipo O:9; *Salmonella* del grupo N (O:30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y otras). *Y. enterocolitica* O:9 posee una cadena O muy próxima a la de *B. abortus*, con N-formil-perosamina en enlaces α 1,2. Su reacción cruzada es la más intensa, y la única que hay que tener en cuenta en el diagnóstico en áreas en las que exista tal serotipo. Además de la cadena O del LPS, las brucellas en fase L contienen un segundo polisacárido habitualmente llamado hapteno nativo. Salvo en la unión al núcleo del LPS, el hapteno nativo es químicamente idéntico a la cadena O su papel biológico, sin embargo, podría ser diferente, pues el hapteno nativo podría representar una molécula de superficie que inserta entre los LPS-L, contribuiría a dar a la superficie características de tipo L sin incrementar la densidad de LPS y sus secciones internas (Cheri y Walker, 1992; Cloekaert et al., 1993; Díaz *et al.*, 2000).

Respecto a las proteínas de la membrana externa, como en otras bacterias Gram negativas, *Brucella abortus* contiene varias proteínas cuantitativamente mayoritarias en las condiciones habituales de cultivo. Sus características se resumen a continuación, siguiendo su nomenclatura original.

Grupo 1. De peso molecular aparente 88,000-94,000 (88-94 kDa) y posiblemente relacionadas con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura (Sangari y Agüero 1996; Díaz *et al.*, 2000).

Grupo 2. De peso molecular aparente 36-38 kDa, son equivalentes a las porinas de otros Gram negativos formando en estado nativo agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, *omp2a* y *omp2b*, codifican estas porinas, pero solo el segundo parece expresarse *in vitro* (Sangari y Agüero 1996; Díaz *et al.*, 2000).

Grupo 3. De peso molecular aparente 25-31 kDa y codificadas en los genes *omp25* y *omp31*. Se han descrito interacciones muy fuertes con el LPS pero su papel es desconocido. Hay que señalar que *B. abortus* carece del gen *omp31* por lo que solo expresa Omp25 (Sangari y Agüero 1996; Díaz *et al.*, 2000).

Existen también varias lipoproteínas de bajo peso molecular en la envoltura de *Brucella* y se conocen los genes de tres de ellas (*omp19*, *omp16* y *omp10*). También se ha descrito una lipoproteína de peso molecular 9-8 kDa, unida covalentemente al peptidoglicano. La topología de estas proteínas en la membrana externa de *B. melitensis*, se deduce de su estructura y de los estudios con anticuerpos monoclonales. Hay pequeñas diferencias en los perfiles proteicos de la membrana externa de las distintas especies. La más característica afecta las proporciones relativas de los grupos 2 y 3. En *B. abortus* los grupos 2 y 3 están en cantidades iguales en los extractos obtenidos con detergentes, pero en *B. ovis* y *B. melitensis* la relación grupo 3/grupo 2 está aumentada. La mayoría de las

proteínas citadas, presentan epitopes en la superficie de *B. abortus* y *B. melitensis*, pero, como cabría esperar, su grado de exposición es menor que en los mutantes R o que en *B. ovis*. Aunque faltan estudios detallados en brucelosis humana, todas estas proteínas parecen inducir una respuesta serológica significativamente menos intensa que el LPS-L y diversos estudios han demostrado que su utilidad diagnóstica es menor que la de éste (Sangari y Agüero 1996; Díaz *et al.*, 2000).

Epizootiología y Epidemiología

En las diferentes especies que afecta, tanto los machos como las hembras son igualmente susceptibles de infectarse, es importante destacar que el portador de la infección se encuentra aparentemente normal. La brucelosis es una enfermedad que se adquiere a través de las mucosas oral, respiratoria, vaginal y conjuntival (Carmichael y Joubert, 1988; Cheri y Walker, 1992; Enright 1990).

Se ha reportado que la diseminación de la enfermedad puede darse a través de diferentes vías: la vía oral, es la más importante, ya que se presenta por la ingestión de tejido placentario contaminado con *Brucella* (placenta, fetos). Secreciones vaginales se refiere aquellas que persisten después de un aborto o bien las que se presentan durante el estro. Transmisión venérea, se presenta cuando la bacteria se encuentra en la próstata y es eliminada a través del fluido seminal; las secreciones mamarias durante la lactancia se eliminan grandes cantidades de *Brucella* en la leche, la cual será utilizada como alimento de los descendientes o del ser humano; vía urinaria, los machos eliminan por la orina mayor cantidad de bacterias, aumentando el riesgo de transmisión a individuos susceptibles; lesiones en piel, a través de soluciones de continuidad en donde se facilita la penetración de la bacteria. La infección conjuntival es dada por la presencia de material

contaminado en ésta mucosa (Carmichael y Joubert, 1988; Cheri y Walker, 1992; Enright, 1990).

La unión de animales susceptibles con aquellos animales que se encuentran infectados, provoca riesgo de infección para los primeros. De esta forma los animales que han adquirido la infección podrán eliminar la bacteria y provocar la enfermedad en otros animales susceptibles con los cuales conviven.

Patogenia y Cuadro Clínico

El establecimiento de la infección por *Brucella* depende del número y virulencia de la bacteria y la resistencia del huésped, determinada por los factores inmunes específicos y no específicos. Los microorganismos pueden penetrar a través de la mucosa de las cavidades nasal, oral o faríngea (Enright, 1990). Luego del paso por los epitelios de las mucosas, las bacterias son transportadas, ya sea libres o en el interior de las células fagocíticas a los linfonodos regionales, los cuales aumentan de tamaño debido a la inflamación e hiperplasia linfática y reticuloendotelial. Estos cambios pueden requerir varias semanas para desarrollarse y persistir por varios meses. Si la bacteria no es inicialmente localizada y eliminada en los linfonodos regionales, la diseminación por vía linfática y sanguínea a otros órganos puede ocurrir (Cheri y Walker, 1992; Enright, 1990).

En bovinos la resistencia a la infección esta influida por la edad, sexo y estado reproductivo. Las hembras gestantes o sexualmente maduras son más susceptibles que las hembras jóvenes, la infección generalmente se establece por el contacto con fetos abortados y/o placentas contaminadas con la bacteria. En hembras, la bacteria frecuentemente se localiza en linfonodos, bazo, glándula mamaria y útero; en muchos se

encuentra en linfonodos, y en forma poco frecuente en testículos y glándulas sexuales accesorias, especialmente vesícula seminal (Cheri y Walker, 1992; Enright, 1990).

En caninos la transmisión oral y venérea son importantes. Dependiendo de la ruta de infección los perros desarrollan ganglios linfonodos retrofaríngeos, inguinales superficiales o los iliacos externos agrandados. La bacteria causa epididimitis, atrofia testicular y esterilidad en machos. En hembras gestantes provoca aborto infeccioso, placentitis, infección fetal y endometritis granulomatosa crónica (Cheri y Walker, 1992; Enright, 1990).

JUSTIFICACIÓN

Existen en México explotaciones de ganado bovino donde los perros son utilizados en labores de pastoreo o bien en tareas de guardia de las mismas. Muchos de esos lugares mantienen hatos con altos índices de infección por brucelosis. En los bovinos en que se presenta el aborto, las estructuras y fluidos que se eliminan en este, así como el feto, contienen gran cantidad de brucelas que constituyen una fuente de contaminación al medio ambiente y de contagio para otros animales.

Dada la estrecha convivencia que llegan a tener los caninos con los rumiantes, existe la posibilidad de que el feto y la placenta sean removidos a otros sitios e ingeridos por los primeros, que aunado al pobre control y deficientes condiciones sanitarias en algunas explotaciones, puede favorecer la diseminación de la enfermedad a través del perro.

Como ya se mencionó, a nivel mundial existen diferentes estudios que demuestran la seroprevalencia del perro tanto a brucelas lisas como rugosas, así como la posibilidad de desarrollar la infección por inoculación experimental. Con estos antecedentes existe el interés de establecer el papel que desempeña el perro en la transmisión de la brucelosis en el ganado.

HIPÓTESIS

El ambiente en que se cría un perro modifica el riesgo de enfermar, seroconvertir y eventualmente transmitir diferentes especies de *Brucella*.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL:

Analizar el posible papel del perro en la epidemiología de la brucelosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar y comparar la seroprevalencia de anticuerpos contra *Brucella canis* y *Brucella abortus* en los caninos de diferente nicho ecológico o grupo poblacional (urbano, semiurbano y rural).
2. Determinar las proteínas que reconocen los anticuerpos contra *Brucella*, a través de la prueba de Western Blot y establecer si existe alguna relación entre los diferentes grupos poblacionales (urbano, semiurbano y rural).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional y de tipo transversal.

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó la siguiente fórmula: $n = Z^2 pq / d^2$

donde:

n = tamaño de muestra

Z = coeficiente 1.96 (95% nivel de confianza)

p = prevalencia estimada 10%

q = (100 - p)

d = precisión requerida

de donde:

$$Z = 1.96$$

$$Z^2 = 3.8416$$

$$p = 0.1$$

$$p = 0.1$$

$$q = 0.9$$

$$q = 0.9$$

$$d = 0.03$$

$$d^2 = 0.0009$$

sustituyendo: $3.8416 (0.1) (0.9) / 0.0009 = 384$

Para el cálculo de tamaño de muestra se utilizó una prevalencia, en caninos, del 10% de acuerdo a reportes de seroprevalencia a *Brucella*, de diferentes estados de la República, en los últimos 10 años (Flores et al.1977; Alonso 1984; Avalos 1993; González 1997.).

Establecimiento de los diferentes grupos de perros por ambiente ecológico.

Se muestrearon perros mayores de un año de edad, que fueron clasificados en tres nichos ecológicos diferentes, agrupados de la siguiente manera:

Grupo Urbano: Constituido por perros presentados a consulta en las clínicas veterinarias de diferentes puntos de la ciudad de México y sobre los que se tenía, un control e información de sus actividades y animales con los que convivían. Se excluyeron los caninos que, aún con dueño, deambulan solos en la calle y/o convivían con animales de granja.

Grupo Semiurbano: Formado por aquellos caninos capturados por los centros antirrábicos del Distrito Federal y área conurbada, de los cuales se desconocía tanto el dueño como el tipo de animales con los que convivían. Se excluyen los perros sujetos a observación de rabia, ya que su estancia en el antirrábico era corta y no reunían las características establecidas para este grupo.

Grupo Rural: Este quedó integrado por aquellos perros que convivían principalmente con poligástricos (bovinos, ovinos y caprinos), se eligió para este fin la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo.

Los caninos fueron muestreados y se diseñó una ficha de registro que se presenta a continuación.

FICHA DE REGISTRO NUM.

Datos del propietario

Nombre

Dirección

Teléfono

Padecimientos probablemente relacionados con la enfermedad :

Artritis

Fiebre

Fiebre ondulante

Datos del animal

Raza

Sexo

Edad

Cruzas anteriores

Si

No

Abortos Si

No

Gestaciones

Si

No

Nº vivos

Nº muertos

Alimentación:

Comercial

Leche y derivados

Vísceras de bovinos

Carne

Cocida

Cruda

Bovino

Equino

Cerdo

Pollo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Animales con los que convive:

Bovinos

Equinos

Ovinos

Caprinos

Cerdos

Caninos

Toma de muestras.

De los animales registrados se obtuvo una muestra de 5 ml. de sangre por venopunción de la vena cefálica, dicha muestra se depositó en tubos de ensaye sin anticoagulante, para posteriormente separar el suero por centrifugación a 1000 x g durante 20 minutos, extrayéndose este último y conservado en alicuotas en congelación a -20° C hasta su uso en la evaluación serológica.

Antígenos bacterianos.

Para efectuar la prueba de aglutinación en placa y 2 mercapto-etanol se utilizó antígeno de *Brucella canis* (rugoso) al 8% a un pH 8.9 con colorante de rosa de bengala y antígeno de *Brucella abortus* (liso) cepa 19 al 8% a un pH 3.5 con colorante rosa de bengala, elaborado por Pronabive, ambos proporcionados por el laboratorio de bacteriología del CENID-Microbiología, el cual se mantuvo en refrigeración durante todo el curso del trabajo.

Prueba de aglutinación en placa.

A cada suero se le realizó la prueba de aglutinación en placa, con antígeno de *Brucella canis* (rugoso) al 8% a un pH 8.9 con colorante de rosa de bengala y antígeno de *Brucella abortus* (liso) cepa 19 al 8% a un pH 3.5 con colorante rosa de bengala elaborado por Pronabive. Para dicha prueba se utilizó un aglutinoscopio donde se depositan 30µl de suero y 30µl de cada uno de los antígenos por separado, se agitaron con un palillo de madera hasta formar una mezcla uniforme, el aglutinoscopio se mueve de tal manera que produzca un movimiento circular en la mezcla y se efectúa la lectura a los dos minutos para detectar si hay aglutinación, lo cual se consideraría un resultado positivo, según la descripción de Vázquez *et al* (2000).

Prueba de 2 Mercapto-Etanol.

Si se obtenía un resultado positivo en una muestra, esta se sometía a una nueva prueba, pero utilizando el suero en diluciones de 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400 con la finalidad de establecer el título de anticuerpos. Sobre el aglutinoscopio se coloca el suero a las diferentes diluciones, se agregan 30µl de 2 mercaptoetanol, se mezcla con un palillo y se deja reposar durante un minuto, posteriormente se agregan 30µl del antígeno a cada una de las diluciones tanto para *Brucella canis* como para *Brucella abortus*, se mueve en círculos y se efectúa la lectura a los dos minutos, en caso de presentar aglutinación representa un positivo definitivo, de acuerdo con el método de Vázquez *et al.* (2000).

Cepas bacterianas.

Se utilizaron cepas de *Brucella canis* cepa Edi 20, obtenida del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (aislamiento de campo) y *Brucella abortus* cepa 19, obtenida de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. (cepario), procedentes del cepario del laboratorio Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET). Para su propagación se inocularon en placas de agar *Brucella*, las cuales se sembraron a partir de una colonia de la cepa original. Se incubaron durante 48 – 72 horas y posteriormente se corroboró su identidad con tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

Obtención de proteínas bacterianas.

En agar *Brucella* se sembró por separado en cajas de Petri, *Brucella canis* y *Brucella abortus*, se incubaron en una concentración de 5 % de bióxido de carbono, observándose crecimiento a las 48 horas, se hicieron pruebas de tinción de Gram, oxidasa

y catalasa para confirmar la presencia de las bacterias. Se preparó caldo *Brucella* 100 ml y se dividió en dos matraces de 50 ml cada uno para sembrar por separado *Brucella canis* y *Brucella abortus*, transcurridas 72 horas y habiendo observado crecimiento se colocó el contenido de cada matraz en tubos de centrifuga de 50 ml. para centrifugarse a 4000 x g durante 15 minutos a 6° C, desechando el sobrenadante y lavando con PBS en dos ocasiones para finalmente resuspender en SSF y sonicarse a 90 Hz en tres ciclos de un minuto cada uno, con la finalidad de fragmentar la bacteria y conservarla en congelación hasta su uso.

Prueba de inmunotransferencia (Western Blot)

Con la finalidad de determinar que proteínas fueron reconocidas por los sueros positivos a *Brucella canis* como a *Brucella abortus* y si existían proteínas de reconocimiento común, se efectuó una prueba de Western Blot con sueros de cada uno de los grupos. Del grupo urbano se utilizaron tres sueros (dos positivos a *B. canis* y uno negativo), del grupo semiurbano se usaron trece sueros (nueve positivos a *B. canis*, dos a ambas brucellas y dos negativos), del grupo rural se emplearon ocho sueros (seis positivos a *B. abortus*, uno a ambas brucellas y uno negativo), utilizando como único criterio para su selección, el que resultaran incluidos en una de las siguientes categorías: Categoría R) Sueros positivos solo a *Brucella canis* (dos del grupo urbano y nueve del grupo semirural o semiurbano), Categoría L) Sueros positivos solo a *Brucella abortus* (seis del grupo rural), Categoría LR) Sueros positivos a ambas brucellas (dos del grupo semiurbano y uno del grupo rural) y Categoría N) Sueros negativos a ambas brucellas (uno del grupo urbano, dos del grupo semirural o semiurbano y uno del grupo rural). Para caracterizar las proteínas de cada una de las bacterias, así como sus pesos moleculares, se realizó una electroforesis sobre un gel de poliacrilamida con cada una de ellas y un marcador de peso molecular, transfiriéndose posteriormente a un papel de nitrocelulosa el cual finalmente se enfrentó al suero en estudio y un suero anti Ig G canino con un

marcador de peroxidasa para poder identificar las proteínas con las cuales hubo reconocimiento sérico, siguiendo el procedimiento de Alba et al (2001).

Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS).

La separación de las proteínas se llevó a cabo en geles continuos de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS), de forma que las posiciones de las proteínas en el gel fueran en función de sus pesos moleculares. Para ello se empleó una cámara de electroforesis vertical Mini-Protean II Electrophoresis Cell con placas de 8 x 10 cm. (Bio-Rad Labs).

Preparación de los geles (PAGE-SDS) y corrimiento electroforético.

Se prepararon geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 12 %. Entre las placas de vidrio, se colocó el gel de corrimiento o de resolución. Para obtener una óptima resolución de proteínas, se preparó el gel concentrador, el cual se colocó en la parte superior del gel de corrimiento. Después de polimerizar, el gel fue colocado en la cámara de electroforesis que contenía amortiguador de corrimiento. Se retiró cuidadosamente el peine y se colocaron los marcadores de peso molecular con rango de 7.5 a 203 kDa en el pozo destinado para esto, y las proteínas bacterianas en el resto del gel. De cada corrimiento que se realizó, se hicieron dos geles, uno para ser teñido con azul de Coomassie y el otro para ser transferido a membranas de nitrocelulosa para realizar la inmunotransferencia. El corrimiento fue a 110 volts y 120 mA en el concentrador, posteriormente a 110 volts y 75 mA, hasta verificar que la muestra completara el recorrido en el gel de corrimiento, lo cual se realizó en dos horas, en concordancia a lo establecido por Alba *et al* (2001).

Tinción de los geles de poliacrilamida.

Después de finalizar la electroforesis, uno de los geles fue colocado en un recipiente que contenía solución azul de Coomassie en un volumen suficiente para cubrir el gel completamente, la tinción se llevó a cabo por 24 horas en agitación. Posteriormente, el exceso de colorante del gel se eliminó con solución desteñidora, hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas y fue conservado en ácido acético al 10 %. El peso molecular de las proteínas fue estimado por su posición en el gel, comparado con un estándar de proteínas conocido (marcador de peso molecular) corrido en el mismo gel de acuerdo a lo planteado por Alba *et al* (2001).

Inmunotransferencia

Después de separar las proteínas por electroforesis en PAGE-SDS, estas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando como metodología el sistema de emparedado, que consistió en el siguiente orden: papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro. Previamente tanto el gel como la membrana fueron sumergidos, cada uno por separado, en buffer de transferencia durante 15 minutos. Posteriormente se colocó el emparedado en la cámara Trans-Blot de electrotransferencia aplicando 12 volts y 200 miliamperes durante 50 minutos. Terminado el tiempo de corrimiento, la membrana de nitrocelulosa se colocó en un recipiente para ser tratada con leche descremada al 5% por 24 horas, con la finalidad de bloquear la membrana y que no se presentaran uniones no específicas de las proteínas del suero. Se retiró la leche descremada y se lavó la membrana en tres ocasiones con PBS-Tween 20 por 15 minutos cada una. La membrana de nitrocelulosa fue recortada en tiras de aproximadamente 3 milímetros de ancho para posteriormente ser colocadas en la placa de reacción, conforme a lo establecido por Alba *et al* (2001).

Inmunoblots

Una vez obtenidos los antígenos en las tiras de la membrana de nitrocelulosa, cada tira se colocó en cada uno de los pozos de la placa de reacción y en todos se realizó el siguiente procedimiento: se agregó 1ml de PBS-ASB 1% y 50µl del suero canino seleccionado, se mantuvo en agitación durante 1 hora, posteriormente se realizaron 5 lavados, cada uno de tres minutos, con PBS-Tween y un lavado de tres minutos con agua destilada, se agregó el conjugado anti IgG canino en una dilución 1:2000 manteniéndose en movimiento durante una hora y posteriormente se realizaron 7 lavados de 2 minutos cada uno con PBS-Tween y un lavado de 2 minutos con agua destilada, para finalmente agregar 1 ml de la solución reveladora (solución de metanol 16.6% en PBS + 0.01% H₂O₂ + 0.05% de cloronaftol) a cada pozo manteniéndose en movimiento durante aproximadamente 15 minutos, tiempo en que aparecen las bandas de identidad deteniendo la reacción al lavar con agua destilada, según lo planteado por Alba et al (2001).

Análisis estadístico

La información contenida en la ficha de registro se analizó para determinar la existencia de factores de riesgo utilizando una prueba de razón de momios para ello, así mismo los resultados serológicos obtenidos en los diferentes grupos, con la prueba de 2 mercapto-etanol, fueron sometidos a una prueba de proporciones X^2 para establecer si hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos, se utilizó el programa Epi-Info 6, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) USA.

TRABAJOS CON
PALABRA DE ORIGEN

RESULTADOS

De acuerdo con la fórmula utilizada: $n = Z^2 pq / d^2$ el tamaño requerido de la muestra fue de 384 caninos. Sin embargo el poco interés mostrado por los M.V.Z. que atienden a los animales del grupo urbano y el temor de los ganaderos en el grupo rural impidió alcanzar dicha cifra.

Grupos Poblacionales

Fueron muestreados en total 303 perros. En el grupo I, que corresponde a los perros urbanos, se obtuvieron 110 muestras, de las cuales 70 fueron de hembras y 40 de machos, correspondiendo el 63.64 % a las hembras y el 36.36 % a los machos, con edades de entre 12 y 144 meses.

En el grupo II, perros semiurbanos, se muestrearon 133 caninos, 85 hembras y 48 machos lo que representa el 63.91 para las hembras y el 36.09 para los machos, con edades entre 12 y 144 meses.

Finalmente en el grupo III, perros rurales, se lograron muestrear 60 caninos, 32 hembras y 28 machos representando el 53.33 % y el 46.66 % respectivamente, con edades entre 12 y 108 meses.

Los resultados totales se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1: Población muestreada en los diferentes grupos.

	TOTAL GENERAL	TOTAL HEMBRAS	TOTAL MACHOS	% HEMBRAS	% MACHOS
GRUPO I	110	70	40	63.64	36.36
GRUPO II	133	85	48	63.91	36.09
GRUPO III	60	32	28	53.33	46.66

DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS

Prueba de Aglutinación en Placa (AP)

Para el grupo I de los 110 perros muestreados, resultaron positivos a la prueba de aglutinación en placa cuatro hembras y un macho, lo que representa el 4.55 % de ésta población.

En el grupo II de los 133 perros muestreados, resultaron positivos a la prueba de aglutinación en placa 19 hembras y 10 machos lo que representó el 21.80 % de dicho grupo.

El grupo III donde se muestrearon 60 perros, 7 hembras y 9 machos resultaron positivos a la prueba de aglutinación en placa, lo que arroja un porcentaje final de 26.66 % para esta población.

Los resultados de los tres grupos se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2: Resultados de los sueros positivos a la prueba de Aglutinación en Placa, con los antígenos de *Brucella canis* (rugoso) y *Brucella abortus* (liso).

Distribución, por grupos, de la respuesta serológica de los perros en la prueba de Aglutinación en Placa

	Animales muestreados	<i>Antígeno liso (B. abortus)</i>		<i>Antígeno rugoso (B. canis)</i>		Ambos antígenos		%TOTAL	%TOTAL
		Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>
GRUPO I	110	0 / 70 0 %	0 / 40 0 %	4 / 70 5.71 %	0 / 40 0 %	0 / 70 0 %	1 / 40 2.5 %	1 / 110 0.91 %	5 / 110 4.55 %
GRUPO II	133	0 / 85 0 %	0 / 48 0 %	17 / 85 20 %	8 / 48 16.66 %	2 / 85 2.35 %	2 / 48 4.16 %	4 / 133 3.01 %	29 / 133 21.80 %
GRUPO III	60	6 / 32 18.75 %	9 / 28 32.14 %	0 / 32 0 %	0 / 28 0 %	1 / 32 3.12 %	0 / 28 0 %	16 / 60 26.66 %	1 / 60 1.66 %
TOTAL	303	6 / 187 3.20 %	9 / 116 7.75 %	21 / 187 11.22 %	8 / 116 6.8 %	3 / 187 1.60 %	3 / 116 2.58 %	21 / 303 6.93 %	35 / 303 11.55 %

Prueba con 2 Mercapto-Etanol (2ME)

Para el grupo I de los 5 perros que resultaron positivos a la prueba de aglutinación en placa, se confirmó dicho número con la prueba de 2 Mercapto-Etanol, cuatro hembras resultaron positivas al antígeno rugoso (*B. canis*) y un macho positivo, tanto al antígeno rugoso (*B. canis*) como al liso (*B. abortus*), el porcentaje total de animales positivos al antígeno rugoso (*B. canis*) fue de 4.55% y el 0.91% resultó positivo al antígeno liso (*B. abortus*), del total de los 110 perros muestreados.

En el grupo II de las 19 hembras y 10 machos que resultaron positivos a la prueba de aglutinación en placa, al efectuar la prueba con 2 Mercapto-Etanol solo 16 hembras se mantuvieron positivas al antígeno rugoso (*B. canis*) y de estas 2 también fueron positivas al antígeno liso (*B. abortus*), de los machos 8 fueron positivos al rugoso (*B. canis*) y de estos 2 también fueron positivos al liso (*B. abortus*), el porcentaje total de animales positivos al antígeno rugoso (*B. canis*) fue de 18.05 % y el 3.01 % resultó positivo al liso (*B. abortus*), de los 133 perros muestreados en este grupo.

En el grupo III, donde se muestrearon 60 perros, de los cuales 16 resultaron positivos a la prueba de aglutinación en placa, se obtuvo el mismo resultado al realizar la prueba con 2 Mercapto-Etanol, 7 hembras resultaron positivas al antígeno liso (*B. abortus*) y de estas una también fue positiva al antígeno rugoso (*B. canis*), de los 9 machos todos resultaron positivos al antígeno liso (*B. abortus*) el porcentaje total de animales positivos al antígeno liso (*B. abortus*) fue de 26.66 % y el 1.66 % resultó positivo al rugoso (*B. canis*).

Los resultados se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3: Resultados de los sueros positivos a la prueba de 2 Mercapto-Etanol, con los antígenos de *Brucella canis* (rugoso) y *Brucella abortus* (liso).

Distribución, por grupos, de la respuesta serológica de los perros en la prueba de 2 Mercapto-Etanol

Animales muestreados	<i>Antígeno liso (B. abortus)</i>		<i>Antígeno rugoso (B. canis)</i>		Ambos antígenos		%TOTAL <i>B. abortus</i>	%TOTAL <i>B. canis</i>
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos		
GRUPO I	110	0 / 70 0 %	0 / 40 0 %	4 / 70 5.71 %	0 / 40 0 %	0 / 70 0 %	1 / 110 0.91 %	5 / 110 4.55 %
GRUPO II	133	0 / 85 0 %	0 / 48 0 %	14 / 85 16.47 %	6 / 48 12.5 %	2 / 85 2.35 %	2 / 48 4.16 %	4 / 133 3.01 %
GRUPO III	60	6 / 32 18.75 %	9 / 28 32.14 %	0 / 32 0 %	0 / 28 0 %	1 / 32 3.12 %	0 / 28 0 %	16 / 60 26.68 %
TOTAL	303	6 / 187 3.20 %	9 / 116 7.75 %	18 / 187 9.62 %	6 / 116 5.17 %	3 / 187 1.60 %	3 / 116 2.58 %	21 / 303 6.93 %

Cuadro 4: Valores porcentuales obtenidos de los sueros positivos a *Brucella abortus*.

	Positivos	%
Grupo I	1 / 110	0.91%
Grupo II	4 / 133	3.01%
Grupo III	16 / 60	26.66%

$p < 0.001$

Utilizando los valores del cuadro 4, se realizó una prueba de proporciones obteniéndose un valor de $p = 0.0000001$ lo que indica que el Grupo III presentó diferencias estadísticamente significativas con el I y el II. Entre el Grupo I y el Grupo II no hubo diferencias estadísticas y se obtuvo un valor de $p = 0.48829$

Cuadro 5: Valores porcentuales obtenidos de los sueros positivos a *Brucella canis*.

	Positivos	%
Grupo I	5 / 110	4.55%
Grupo II	24 / 133	18.05%
Grupo III	1 / 60	1.66%

$p < 0.001$

Utilizando los valores del cuadro 5, se realizó una prueba de proporciones obteniéndose un valor de $p = 0.000124$ lo que indica que entre los el Grupo II presentó diferencias estadísticamente significativas con el I y el III. Entre el Grupo I y el Grupo III no hubo diferencias estadísticas y se obtuvo un valor de $p = 0.591122$.

Respecto a los títulos obtenidos en cada uno de los grupos para los diferentes tipos de brucelas se presentan en el cuadro 6:

Cuadro 6: Títulos obtenidos en cada grupo de perros a los antígenos lisos y rugosos.

	LISAS					RUGOSAS				
	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400
GRUPO I					1					5
GRUPO II				2	2			2	2	20
GRUPO III		1	8	4	3					1

NICHO ECOLÓGICO (GRUPO POBLACIONAL) COMO FACTOR DE RIESGO

El nicho ecológico es un factor de riesgo para el desarrollo de anticuerpos contra brucelas rugosas y lisas en el perro, en el análisis se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 7: Resultados de los perros positivos a antígeno de brucelas rugosas por nicho ecológico de origen :

Nicho ecológico	Positivo	Negativo	Total
Urbano	5	105	110
Semiurbano	24	109	133
Rural	1	59	60
Total	30	273	303

En razón de momios se obtuvo un valor de 4.62 para los animales positivos a antígenos rugosos (R.M. 4.62, I.C. 1.59 – 14.40), lo que significa que los animales del nicho ecológico semiurbano tienen 4.62 veces más riesgo de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que no pertenecen a ese grupo poblacional.

Cuadro 8: Resultados de los perros positivos a antígeno de brucelas lisas por nicho ecológico de origen :

Nicho ecológico	Positivo	Negativo	Total
Urbano	1	109	110
Semiurbano	4	129	133
Rural	16	44	60
Total	21	282	303

En razón de momios se obtuvo un valor de 11.73 para los animales positivos a antígeno liso (R.M. 11.73, I.C. 3.42 – 44.11), lo que significa que los animales del nicho ecológico rural tienen 11.73 veces más riesgo de ser positivos a brucelas lisas en comparación con los que no pertenecen a ese grupo poblacional.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TIPO DE ALIMENTO COMO FACTOR DE RIESGO

Evaluando si el tipo de alimento es un factor de riesgo para el desarrollo de anticuerpos contra brucelas rugosas en el perro, se observaron los siguientes resultados:

Para los animales que se alimentan con todo tipo de comida, en razón de momios se obtuvo un valor de 5.66 (R.M. 5.66, I.C. 1.98 – 17.42), lo que significa que estos animales tienen 5.66 veces más riesgo de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que no reciben este tipo de alimentación. Asimismo, para los animales que no comen alimento comercial y consumen alimentos no determinados, en razón de momios se obtuvo un valor de 5.87 (R.M. 5.87, I.C. 2.19 – 16.62), lo que significa que dichos animales tuvieron 5.87 veces más riesgo de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que reciben este alimento.

Evaluando si el tipo de alimento es un factor de riesgo para el desarrollo de anticuerpos contra brucelas lisas en el perro, se observaron los siguientes resultados:

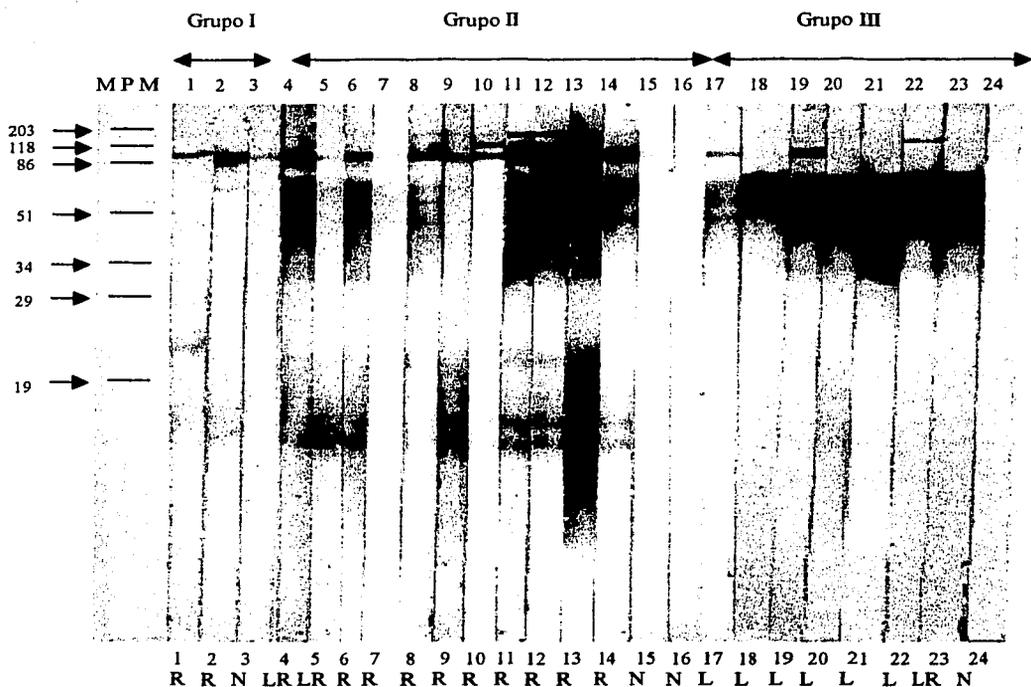
Para los animales que se alimentan con vísceras, en razón de momios se obtuvo un valor de 25.89 (R.M. 25.89, I.C. 6.80 - 104.12), lo que significa que estos animales tienen 25.89 veces más riesgo de ser positivos a brucelas lisas en comparación con los que no reciben este alimento. Asimismo, los animales que se alimentan con todo tipo de comida, en razón de momios se obtuvo un valor de 4.56 (R.M. 4.56, I.C. 1.40 – 16.48), lo que significa que dichos animales tienen 4.56 veces más riesgo de ser positivos a brucelas lisas en comparación con los que no reciben este tipo de alimentación.

El resto de las variables raza, sexo, edad, apareamientos y número de gestaciones no demostró ser un factor de riesgo.

**PROTEÍNAS QUE RECONOCEN LOS ANTICUERPOS DE LOS PERROS
POSITIVOS A ANTÍGENOS DE *Brucella*, EN LA PRUEBA DE
INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).**

Para determinar que proteínas reconocían los sueros positivos a los antígenos lisos y rugosos (*B. abortus* y *B. canis*), los sueros se enfrentaron a las corridas electroforéticas de las proteínas de *B. canis* y *B. abortus* en la prueba de inmunotransferencia (Western Blot), empleando sueros de cada uno de los grupos. Con la electroforesis, en *B. abortus* se identificaron cinco proteínas de peso molecular 120 kDa, 109 kDa, 84 kDa, 77 kDa, y 57 kDa. Con la inmunotransferencia se detectaron 16 proteínas cuyos pesos moleculares fueron 149 kDa, 140 kDa, 120 kDa, 109 kDa, 92 kDa, 84 kDa, 77 kDa, 63 kDa, 57 kDa, 48 kDa, 43 kDa, 25 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 14 kDa y 10 kDa. En *B. canis*, con la electroforesis, se identificaron siete proteínas de peso molecular 132 kDa, 112 kDa, 84 kDa, 77 kDa, 72 kDa, 65 kDa y 52 kDa. Con la inmunotransferencia se detectaron 25 proteínas cuyos pesos moleculares fueron 169 kDa, 150 kDa, 132 kDa, 112 kDa, 98 kDa, 92 kDa, 84 kDa, 77 kDa, 72 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 57 kDa, 52 kDa, 48 kDa, 46 kDa, 43 kDa, 37 kDa, 31 kDa, 25 kDa, 19 kDa, 18 kDa, 16 kDa, 14 kDa, 12 kDa y 10 kDa. Las proteínas presentadas en forma exclusiva por *B. abortus* fueron 149 kDa, 140 kDa, 120 kDa, 109 kDa y 63 kDa. Las proteínas presentadas en forma exclusiva por *B. canis* fueron 169 kDa, 150 kDa, 132 kDa, 112 kDa, 98 kDa, 72 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 52 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 31 kDa, 18 kDa y 12 kDa. Las proteínas comunes para ambas bacterias fueron 92 kDa, 84 kDa, 77 kDa, 57 kDa, 48 kDa, 43 kDa, 25 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 14 kDa y 10 kDa. Las categorías y los resultados se presentan en la figura 1, figura 2 y el cuadro 9.

Figura 1. Resultados de la prueba de Inmunotransferencia, enfrentando los sueros a las proteínas de *Brucella abortus*.



MPM = Marcador de peso molecular

R = Positivo a *Brucella rugosa* (Categoría R)

L = Positivo a *Brucella lisa* (Categoría L)

LR = Positivo a *Brucella lisa* y rugosa (Categoría LR)

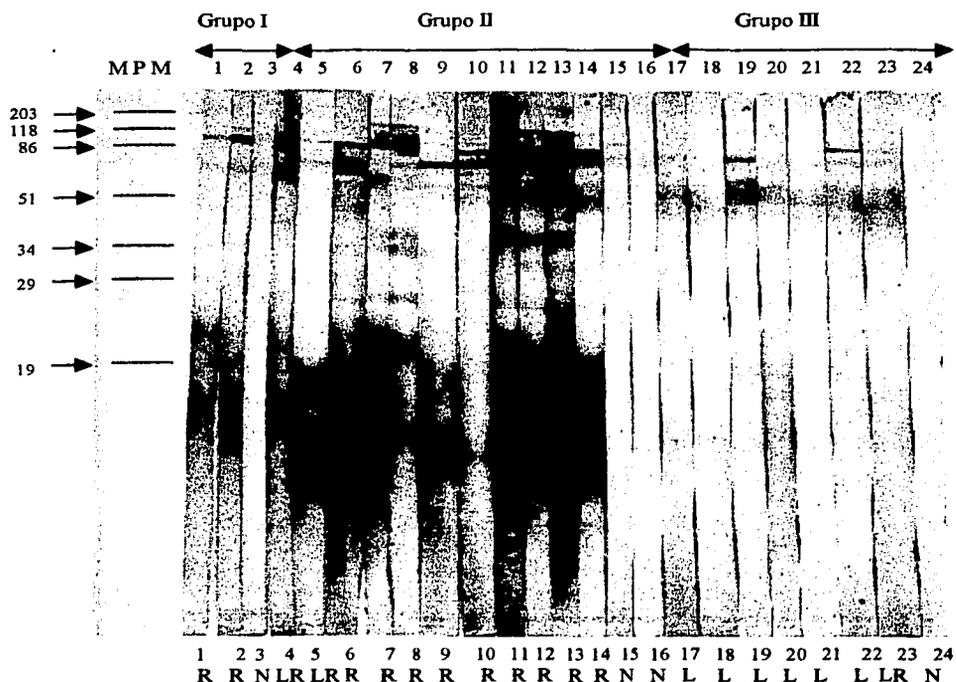
N = Negativo a *Brucella* (Categoría N)

Grupo I (Urbano)

Grupo II (Semiurbano)

Grupo III (Rural)

Figura 2. Resultados de la prueba de Inmunotransferencia, enfrentando los sueros a las proteínas de *Brucella canis*.



MPM = Marcador de peso molecular

R = Positivo a *Brucella rugosa* (Categoría R)

L = Positivo a *Brucella lisa* (Categoría L)

LR = Positivo a *Brucella lisa* y *rugosa* (Categoría LR)

N = Negativo a *Brucella* (Categoría N)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Grupo I (Urbano)

Grupo II (Semiurbano)

Grupo III (Rural)

CUADRO 9: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNOTRANSFERENCIA EN LAS DIFERENTES CATEGORÍAS.

Peso molecular proteína	Sueros enfrentados a proteínas de <i>B. abortus</i>				Sueros enfrentados a proteínas de <i>B. canis</i>			
	Categoría R	Categoría L	Categoría LR	Categoría N	Categoría R	Categoría L	Categoría LR	Categoría N
	Positivos a <i>B. rugosa</i> n = 11	Positivos a <i>B. lisa</i> n = 6	Positivos a ambas n = 3	Negativos a Brucella n = 4	Positivos a <i>B. rugosa</i> n = 11	Positivos a <i>B. lisa</i> n = 6	Positivos a ambas n = 3	Negativos a Brucella n = 4
160 R					1/11	0/6	0/3	0/4
150 R					9.09%	0%	0%	0%
140 L	1/11	0/6	0/3	0/4	1/11	1/6	0/3	0/4
140 L	9.09%	0%	0%	0%	9.09%	16.66%	0%	0%
132 R								
120 L	4/11	0/6	0/3	0/4				
120 L	36.36%	0%	0%	0%				
120 R					2/11	0/6	0/3	0/4
112 R					18.18%	0%	0%	0%
100 L								
100 L	0/11	1/6	0/3	1/4	4/11	1/6	0/3	0/4
98 R					36.36%	16.66%	0%	0%
92 L	1/11	1/6	0/3	0/4				
92 L	9.09%	16.66%	0%	0%				
92 L	1/11	0/6	1/3	1/4	2/11	0/6	0/3	0/4
92 L	9.09%	0%	33.33%	25%	1/11	0/6	0%	0%
84 L	10/11	1/6	2/3	1/4	9.09%	0%	1/3	1/4
84 L	90.90% *	16.66%	66.66%	25%	3/11	2/6	2/3	1/4
77 L	0/11	3/6	0/3	0/4	27.27%	33.33%	66.66%	25%
77 L	0%	50% *	0%	0%	7/11	1/6	1/3	0/4
72 R					63.63% *	16.66%	33.33%	0%
72 R					0/11	3/6	0/3	0/4
70 R					0%	50%	0%	0%
70 R					1/11	0/6	2/3	1/4
65 R					9.09%	0%	66.66%	25%
65 R					5/11	0/6	0/3	1/4
65 R					45.45%	0%	0%	25%
63 L								
63 L	3/11	1/6	0/3	0/4				
57 L	27.27%	16.66%	0%	0%				
57 L	9/11	3/6	3/3	1/4	6/11	1/6	1/3	0/4
57 L	81.81% *	50%	100%	25%	54.54%	16.66%	33.33%	0%
52 R					6/11	0/6	2/3	2/4
52 R					54.54%	0%	66.66%	50%
48 L	0/11	3/6	0/3	0/4	0/11	3/6	0/3	0/4
48 L	0%	50%	0%	0%	0%	50% *	0%	0%
46 R					6/11	2/6	0/3	0/4
46 R					54.54%	33.33%	0%	0%
43 L	6/11	1/6	0/3	0/4	3/11	1/6	2/3	0/4
43 L	54.54%	16.66%	0%	0%	27.27%	16.66%	66.66%	0%
37 R								
37 R					4/11	0/6	1/3	0/4
31 R					36.36%	0%	33.33%	0%
31 R					10/11	2/6	3/3	2/4
25 R					90.90% *	33.33%	100%	50%
25 L	6/11	0/6	0/3	0/4	9/11	0/6	2/3	0/4
25 L	54.54%	0%	0%	0%	81.81% *	0%	66.66%	0%
19 L	8/11	1/6	3/3	1/4	7/11	0/6	1/3	1/4
19 L	72.72% *	16.66%	100%	25%	63.63% *	0%	33.33%	25%
16 R								
16 R					8/11	4/6	2/3	0/4
16 L					72.72% *	66.66% *	66.66%	0%
16 L	8/11	2/6	3/3	0/4	6/11	2/6	2/3	2/4
16 L	72.72% *	33.33%	100%	0%	54.54%	33.33%	66.66%	50%
14 L	8/11	4/6	2/3	2/4	5/11	4/6	2/3	0/4
14 L	72.72% *	66.66% *	66.66%	50%	45.45%	66.66% *	66.66%	0%
12 R					0/11	3/6	0/3	2/4
12 R					0%	50%	0%	50%
10 L	2/11	1/6	0/3	0/4	5/11	1/6	2/3	1/4
10 L	18.18%	16.66%	0%	0%	45.45%	16.66%	66.66%	25%

L = proteína presente en *B. abortus*
R = proteína presente en *B. canis*

* = proteínas con alto reconocimiento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Una de las pruebas serológicas más empleada en el diagnóstico de brucelosis canina, es la aglutinación en placa, la cual puede dar lugar a resultados falsos-positivos. Para reducir el número de estas reacciones, las pruebas pueden ser modificadas por la adición de solución de 2 mercapto-etanol, al suero, antes de efectuar la prueba. La finalidad de tratar el suero con esta solución es romper los puentes de disulfuro de la IgM con el propósito de inactivar la aglutinación, por reacción cruzada o por una respuesta vacunal por parte de ésta, el procedimiento no reduce la sensibilidad y aumenta mucho la especificidad (Cheri y Walker, 1992; Díaz *et al.*, 2000), a pesar de esto pueden ocurrir falsos negativos. La prueba de aglutinación en placa agregando 2 mercapto-etanol es probablemente la más usada para detectar infecciones por *B. canis* en perros. Esta prueba tiene algunas ventajas sobre otras pruebas serológicas como son, una sensibilidad alta, puede detectar anticuerpos desde la tercera o cuarta semana después de la infección, es barata, rápida y fácil de realizar, aunque algunos resultados (aproximadamente el 1 %) pueden ser falsos negativos. Esta es una excelente prueba, sin embargo, debido a la probabilidad de reacciones falsas positivas, esta prueba no es definitiva para el diagnóstico de *B. canis*, por lo tanto todas las reacciones positivas deberían ser confirmadas por otros métodos. El diagnóstico definitivo de brucelosis esta basado en el aislamiento de la bacteria ya sea de tejidos infectados o de la sangre (Cheri y Walker, 1992; Díaz *et al.*, 2000).

Dada la naturaleza insidiosa de la bacteria, el hecho de que los animales infectados no muestran síntomas claros de la enfermedad, el que estos pueden tener una bacteremia que va de los seis meses hasta por más de cinco años, así como las condiciones en las que se desarrollan los perros del medio suburbano y rural, se posibilita la ingestión o

inhalación de la bacteria por el contacto de animales sanos, con fluidos o secreciones corporales de animales infectados con la consecuente diseminación de la enfermedad.

Con la información contenida en las hojas de registro de los animales muestreados, se analizaron los diferentes con la finalidad de establecer que variables representaron o no un factor de riesgo en la población estudiada. Las variables que mostraron ser un factor de riesgo para la población en estudio fueron, el nicho ecológico de origen y el tipo de alimento, particularmente el consumo de vísceras de bovinos (incluidos fetos y placentas) y los que se alimentan de todo tipo de comida. El resto de las variables raza, sexo, edad, apareamientos y número de gestaciones no demostró ser un factor de riesgo, lo que concuerda con algunos reportes en la literatura (Germano, 1987; Srinivasan, 1992).

Referente a los resultados obtenidos en este trabajo con la prueba de aglutinación en placa, de cincuenta perros que resultaron positivos a alguna *Brucella*, cuarenta y cinco fueron ratificados con la prueba de 2 mercapto-etanol lo que representa el 90 % de los positivos a ambas pruebas, cabe destacar que los cinco caninos descartados con la prueba de 2 mercapto-etanol, tres hembras y dos machos, fueron positivos solo a *Brucella canis* (por prueba en placa) y pertenecían al Grupo II (suburbano). Esta respuesta con mercapto-etanol se atribuye a una reacción principalmente por IgM y pudo deberse a una infección reciente de los animales.

Alton (1988) sugiere que el suero canino sea mezclado con el mercapto-etanol en un tubo de ensayo antes de la prueba y de esta mezcla utilizar el suero para ser enfrentado al antígeno, en un intento de reducir resultados falsos positivos: este fenómeno fue eliminado en estos ensayos debido a que se mezclaron el suero y el mercapto-etanol en la placa, se dejó reposar dos minutos y después se agregó el antígeno tal y como lo sugiere dicho autor.

Respecto a los porcentajes de caninos que resultaron positivos, en la población total, para el antígeno rugoso, con la prueba de aglutinación en placa, se obtuvieron los siguientes resultados: en el Grupo I 4.55 % , en el Grupo II 21.80 % y en el Grupo III 1.66 % (cuadro 2). Los resultados finales con la prueba de aglutinación, utilizando 2 mercapto-etanol, en los diferentes grupos es muy similar a los datos reportados a nivel mundial (Germano *et al.*, 1987; Cortes *et al.*,1988; Taylor y Perdue, 1989; Delgado y Centorbi, 1990; Thanappa *et al.*, 1990; Feitosa *et al.*, 1991; Katami *et al.*, 1991; Mateu y Martín, 1993; Ahmad y Munir, 1995; Liu-Dao Xin *et al.*, 1996). La respuesta al antígeno rugoso en los perros caseros alcanza el 4.63 % (Mateu y Martín, 1993;) y este ensayo registró en los perros urbanos (Grupo I) el 4.55 %, mientras en los perros callejeros se reporta el 15.23 % (Cortes *et al.*,1988; Mateu y Martín, 1993) en este estudio los perros callejeros (Grupo II semiurbanos) representan el 18.05 % y en los perros de granja se reporta el 3.07 % (Srinivasan *et al.*, 1992), en esta investigación los perros de granja (Grupo III) constituyeron el 1.66% (cuadro 2 y 3).

Respecto al uso de la prueba de aglutinación en placa agregando 2 mercaptoetanol, para la detección de anticuerpos contra *Brucella rugosa (B. canis)* en caninos, ésta se considera muy sensible y con una buena especificidad (Cheri y Walker, 1992; Díaz *et al.*, 2000), Necsulescu (1995) recomienda su uso para tal fin, así mismo Baldi (1997) realizó un estudio con el objeto de correlacionar la prueba antes mencionada, comparándola con la prueba de ELISA, y obtuvo una confiabilidad para la prueba del 93.33 %, lo que confiere un buen apoyo a los resultados presentados en este trabajo.

El punto de corte efectuado a los sueros que fueron sometidos a la prueba de aglutinación en placa con 2 mercaptoetanol fue de 1/25, ya que de acuerdo con lo mencionado en la literatura (Cheri y Walker, 1992) perros infectados, con títulos de 1/50 pueden estar cursando una baja bacteremia y sin embargo permanecer con la bacteria en tejidos infectados, en este estudio los sueros positivos al antígeno rugoso presentaron

títulos de 1/100 o más, lo que sugiere que pueden ser considerados como infectados por la bacteria (cuadro 6).

En las seroprevalencias por grupo pueden influir los hábitos del perro y los cuidados que reciben. Los caninos del Grupo I, en la mayoría de los casos, crecen y se desarrollan en un ambiente controlado, ya que los propietarios procuran seguir un calendario de inmunizaciones y, hasta no haberlas cubierto, controlan sus salidas, por medio de collares y correas, fuera de la casa o el lugar donde habitan, así como el contacto con otros caninos que aparentemente no tienen propietario (perros callejeros). Los perros pertenecientes al Grupo II generalmente no tienen propietario y en caso de tenerlo su comportamiento sería como el de los callejeros, esto es, el deambular en las calles de la ciudad o los pueblos o en las diversas rancherías, estos caninos tienen 4.62 veces más riesgo de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que no pertenecen a este grupo poblacional (cuadro 7).

Los hábitos alimenticios de los diferentes grupos también establecen diferencias, el Grupo I aunque generalmente consume alimento balanceado comercial (croquetas) también se encuentra expuesto al consumo de leche sin pasteurizar y derivados de ésta, no obstante dependerá de los hábitos alimenticios de los dueños y los que aplican cuando alimentan a sus perros. El Grupo II tratará de alimentarse con lo que encuentre y consumirá todo lo que sea un posible alimento, incluidas vísceras de bovinos (fetos, placentas u otros órganos), esto provoca que los perros que comen de todo tipo de alimento tengan 5.66 veces más riesgo de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que no reciben este tipo de alimentación. Así mismo los animales que no comen alimento comercial tuvieron 5.87 veces más riesgo de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que reciben este alimento, sumado al nicho ecológico de origen el cual representa 4.62 veces, más riesgo, de ser positivos a brucelas rugosas en comparación con los que no pertenecen a este grupo poblacional (cuadro 7).

Respecto a los porcentajes en la población total, de caninos que resultaron positivos, para el antígeno liso con la prueba de aglutinación en placa, se tienen los siguientes resultados: en el Grupo I 0.91 % , en el Grupo II 3.01 % y en el Grupo III 26.66 %. Los resultados finales con la prueba de aglutinación, utilizando 2 mercaptoetanol, en los diferentes grupos es muy similar a lo reportado a nivel mundial (Germano *et al.*, 1987; Cortes *et al.*, 1988; Taylor y Perdue, 1989; Delgado y Centorbi, 1990; Thanappa *et al.*, 1990; Feitosa *et al.*, 1991; Katami *et al.*, 1991; Mateu y Martín, 1993; Ahmad y Munir, 1995; Liu-Dao Xin *et al.*, 1996). La respuesta al antígeno liso, reportada es del 1.99 % en los perros caseros (Mateu y Martín, 1993), en este trabajo en los perros urbanos (Grupo I) fue de 0.91 % , en los callejeros alcanza el 9.24 % (Cortes *et al.*, 1988; Mateu y Martín, 1993) en este informe los resultados para los perros callejeros (Grupo II semiurbanos) es de 3.01% y se reporta hasta un 37 % en los perros de granja (Delgado y Centorbi, 1990; Tian *et al.*, 1990; Srinivasan *et al.*, 1992; Medeiros, 1995; Talebkan *et al.*, 1997) y en esta muestra para los perros de establo (Grupo III) se obtuvo el 26.66 % (cuadro 2 y 3).

Respecto al uso de la prueba de aglutinación en placa, agregando 2 mercaptoetanol, para la detección de anticuerpos contra *Brucella* lisa (*B. abortus*) en caninos, Mateu (1993) y Tian (1990) la utilizaron para realizar sus estudios en perros y la consideraron de buena confiabilidad al compararla con otras pruebas de diagnóstico. El valor de corte empleado para los sueros fue también de 1/25, siguiendo el mismo lineamiento que para el antígeno rugoso, de los sueros positivos en este trabajo solo uno presentó una aglutinación de 1/50, el resto de los sueros presentó valores de 1/100 o más.

Los caninos del Grupo III son perros que se encuentran libres dentro de su hábitat con la finalidad de que cumplan con sus labores de guardia y pastoreo, aunque es muy común que estos perros pasen de un establo a otro en ocasiones sin ninguna vigilancia.

Tanto en el grupo II y III el contacto con otros caninos para establecer dominios de territorio, jerarquías y apareamientos, ocurre sin control, lo que favorece el contagio y/o diseminación no solo de *Brucella*, sino de casi cualquier otra enfermedad..

Algunos de los caninos del Grupo III son alimentados con alimento comercial, sin embargo, se encuentran más expuestos al consumo de leche sin pasteurizar y derivados de ésta, ya que se encuentra en el lugar donde se originan dichos insumos, así mismo debido a su comportamiento y el espacio que habitan, son capaces de alimentarse de fetos abortados y placentas, esto al parecer es lo que induce que tengan 25.89 veces más riesgo de ser positivos a brucelas lisas en comparación con los que no consumen este tipo de productos, aunado al nicho ecológico de origen el cual representa 11.73 veces, más riesgo, de ser positivos a brucelas lisas en comparación con los que no pertenecen a este grupo poblacional (cuadro 8).

En el Grupo III la infección por *Brucella* adquiere primordial importancia, ya que las estructuras y envolturas ,producto del aborto, pueden ser obtenidas en un establo y ser acarreadas a otro, distante o no, pero que implican, en caso de estar infectadas con *Brucella*, el traslado y diseminación de la enfermedad, convirtiéndose el perro en portador y diseminador de la enfermedad.

Con la prueba de inmunotransferencia (Western Blot) el reconocimiento por los sueros, de las proteínas fraccionadas de *B. abortus* y *B. canis*, aumenta la confiabilidad a los resultados de las pruebas de placa, aunque el reconocimiento fue muy bajo para algunas de ellas y en algunos casos los sueros negativos también reconocieron algunas de estas proteínas. Se demostraron proteínas de peso molecular semejante en el fraccionamiento de *B. abortus* y *B. canis*, sin embargo en todos los casos sus respuestas al

reconocimiento por los sueros fueron distintas, lo que sugiere que no eran las mismas proteínas, aunque si tenían pesos moleculares muy cercanos y corrieron en forma similar en el gel, o bien la exposición de la proteína en las bacterias lisas y rugosas es diferente y expresa diferente inmunogenicidad. Los antígenos de origen rugoso fueron más reconocidos, incluso por los sueros positivos a antígenos lisos y a su vez los sueros positivos a antígenos rugosos reconocieron mayor número de proteínas y en mayor proporción que los positivos a antígenos lisos, aun al enfrentarlos con las proteínas de origen liso.

Hay proteínas que solo están presentes en una de las bacterias y proteínas que se encuentran en ambas. En el caso de las primeras las proteínas 63 kDa, 109 kDa, 120 kDa, 140 kDa y 149 kDa solo están presentes en la bacteria lisa y son reconocidas por una o varias categorías. La proteína 63 kDa y 140 kDa son las más reconocidas en este caso, sin embargo son identificadas mayoritariamente por los perros de la categoría R, los cuales son positivos al antígeno rugoso en la prueba de 2 mercapto-etanol.

Respecto a las proteínas que sólo están presentes en la bacteria rugosa, se encuentran la 12 kDa, 18 kDa, 31 kDa, 37 kDa, 46 kDa, 52 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 72 kDa, 98 kDa, 112 kDa, 132 kDa, 150 kDa y 169 kDa. Cabe destacar que las proteínas 18 kDa, 31 kDa, 46 kDa y 52 kDa tienen un alto reconocimiento por los sueros de la categoría R que son positivos al antígeno rugoso en la prueba de 2 mercapto-etanol. Las proteínas 18 kDa, 31 kDa y 46 kDa son altamente reconocidas y pudiera ser motivo de estudio si se confirmara que alguna de estas es característica de brucelas rugosas. En relación a las proteínas 52 kDa y 37 kDa no son reconocidas en ningún caso por la categoría L (positivos al antígeno liso) y aunque la 52 kDa es reconocida por dos de los sueros negativos, estos no pertenecen al grupo rural, lo cual es de llamar la atención.

De las proteínas que se encuentran presentes en ambas bacterias requiere especial mención la proteína 48 kDa presente, reconocida solo por sueros reactivos al antígeno liso, pertenecientes a la categoría B (positivos al antígeno liso) y no es reconocida por ninguna de las otras categorías ni por los negativos. Las proteínas 25 kDa, 43 kDa, 57 kDa y 77 kDa son reconocidas en ambas bacterias. Aquí lo importante es mencionar que los sueros negativos no las reconocen en ninguno de los casos, tal parece que estas proteínas son antígenos comunes para ambas bacterias *B. canis* y *B. abortus*.

Finalmente las proteínas 10 kDa, 14 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 84 kDa, y 92 kDa son reconocidas por las diferentes categorías, al enfrentarlos tanto al antígeno liso como rugoso, lo que podría sugerir proteínas no específicas o bien una respuesta cruzada con otras bacterias.

Las proteínas con alto reconocimiento fueron marcadas con asterisco (*) en el cuadro 13, de éstas, la proteína 48 kDa aunque presente en las dos bacterias únicamente es reconocida por los sueros de la categoría L (perros del grupo III , nicho ecológico rural); la proteína 18 kDa y 31 kDa presentes sólo en *B. canis* y con alto reconocimiento por los sueros de la categoría R; las proteínas 16 kDa, 57 kDa y 84 kDa presentes en ambas bacterias pero con mayor reconocimiento por la categoría R, al presentarse en *B. abortus*, la proteína 19 kDa y 77 kDa presentes en ambas bacterias pero con mayor reconocimiento al presentarse en *B. canis* y finalmente las proteínas 14 kDa y 25 kDa presente en ambas bacterias y con alto reconocimiento en ambas.

CONCLUSIONES

1. El nicho ecológico en el que se desarrolla un canino influye en la especie de *Brucella* con la que se puede infectar.
2. Los perros que conviven con bovinos tienen mayor probabilidad de infectarse por brucelas lisas que aquellos que no están en contacto con ellos y estos caninos deberán considerarse en el establecimiento de los programas de control de la brucelosis bovina.
3. Los perros que se encuentran libres en las zonas suburbanas tienen mayor riesgo de infectarse por brucelas rugosas que aquellos que habitan en otro medio, de igual manera presentan una mayor prevalencia a brucelas lisas que los perros del área urbana, lo que puede representar un riesgo para los animales productivos y la población humana.
4. Se observó respuesta cruzada en los sueros positivos de los perros con los antígenos de *Brucella canis* y *Brucella abortus*.
5. Las proteínas de peso molecular 12 kDa, 18 kDa, 31 kDa, 37 kDa, 46 kDa, 52 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 72 kDa, 98 kDa, 112 kDa, 132 kDa, 150 kDa y 169 kDa, solo se presentaron en los corrimientos de *Brucella canis*, sin embargo los sueros de caninos reactivos a brucelas rugosas responden con mayor intensidad particularmente con las proteínas de 18 kDa y 31 kDa.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad R; Munir MA., Sero-prevalence of brucellosis in horses, dogs, cats and poultry. *Pakistan Veterinary Journal*. 1995, 15: 2, 85-88; .
2. Alonso L. E., Presencia de Brucelosis canina en la ciudad de Monterrey y su área metropolitana., Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N. L., 1984.
3. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M., Techniques for the brucellosis laboratory., Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1988.
4. Avalos R. R., Ramírez A., Wong G. A., Seroprevalencia de *Brucella canis* en perros clínicamente sanos del área metropolitana de Monterrey, N. L., Memorias XXIV Congreso AMMVEPE, Monterrey, N. L., 1993.
5. Berthelot X; Garin Bastuji B., Canine brucellosis. *Point Veterinaire.*, 25: 152, 125-129; France, 1993.
6. Baldi PC; Wanke MM; Loza ME; Monachesi N; Fossati CA., Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella spp.* *Veterinary Microbiology*. 1997, 57: 2-3, 273-281; .
7. Carmichael L.E., Joubert J.C., Transmission of *Brucella canis* by contact exposure., *Cornell Vet.*, 78, 63-73, 1988.

8. Cloeckert A., et. al., Monoclonal antibodies to *Brucella* rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *B. abortus*, Res. Microbiol., 144, pp 475-484, 1993.
9. Cortes VA; Oliveira MCG-de; Ito FH; Vasconcellos SA. Serological reactions for *Brucella canis* in stray dogs captured near public parks and in the outskirts of Sao Paulo city, Brazil. Revista da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo. 1988, 25: 1, 101-107; .
10. Cheri A.J., Walker R.D., Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection., Compendium Small Animal, 14, pp 763-772, 1992.
11. Davis DS; Heck FC; Williams JD; Simpson TR; Adams LG. Interspecific transmission of *Brucella abortus* from experimentally infected coyotes (*Canis latrans*) to parturient cattle. Journal of Wildlife Diseases. 1988, 24: 3, 533-537; .
12. Delgado MG; Centorbi ONP de., Serological study of brucellosis in farm dogs in rural areas of San Luis Province, Argentina. Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires. 1990, 71: 2, 74-78; .
13. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano et al., Diagnóstico de Brucelosis Animal, INIFAP, México, 2000.
14. Enright F.M., The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals., en: Animal Brucellosis., Eds. Nielsen K. and Duncan J.R., CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla., 1990.

15. Feitosa MH; Bittar CR; Gomes SP Brucellosis: serological survey in Sao Paulo State over the period 1977-87. *Veterinaria e Zootecnia*. 1991, 3: 9-15; .
16. Flores R., Suárez G.F., Ramírez R., Carmichael L.E., Canine Brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in México city, *Journal of Microbiology*, 6: 591-597, 1977.
17. Forbes LB., *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1990, 196: 6, 911-916; .
18. Galiero G; Blasio E de; Carlucci D; Bartoli M; De Blasio E. The dog and ovine-caprine brucellosis. *Selezione Veterinaria*. 1991, 32: 10, 1515-1518; .
19. Garin Bastuji B; Colcanap M; Trap D. The dog as a potential reservoir of brucella infection in attested herds, as exemplified by a case in Cotes du Nord. *Epidemiologie et Sante Animale*. 1988, No. 13, 69-79; .
20. Germano PML; Vasconcellos SA; Ishizuka MM; Passos E de C; Erbolato EB Prevalence of *Brucella canis* infections in dogs of the city of Campinas, SP, Brazil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo*. 1987, 24: 1, 27-34; .
21. González M. E., Determinación de anticuerpos contra *Brucella canis* en *Canis familiaris* en la ciudad de Córdoba, Veracruz., Tesis de Licenciatura., Veracruz, Ver., 1997.

22. 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]. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1991, 53: 6, 1113-1115; .
23. Kopczewski A; Krolak M; Arent Z; Rudnicki K. A case of brucellosis in a male dog. *Zycie Weterynaryjne*. 1995, 70: 7, 230-231; .
24. Liu DaoXin; Qi JunZheng; Ding GuoHua; Ren FengMei; Shi LiLiang; Liu DX; Qi JZ; Ding GH; Ren FM; Shi LL. A survey of dogs diseases in Hunan Province. I. Serological investigation of six zoonoses. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*. 1996, 22: 2, 53-54.
25. Mateu de Antonio EM; Martin M; Soler M. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 1993, 54: 7, 1043-1046; .
26. Mateu de Antonio EM; Martin Castillo M. Seroepidemiological studies of *Brucella canis* and smooth brucellae in dogs. *Medicina Veterinaria*. 1993, 10: 4, 241-243, 246; 19 .
27. Mateu de Antonio EM; Martin M; Casal J., Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1994, 6: 2, 257-259; .

28. Medeiros F., Survey for *Dirofilaria* sp. and for antibodies to *Brucella abortus* in dogs on S. Miguel Island. *Veterinaria Tecnica*. 1995, 5: 6, 24-26; 6 .
29. Moon JS; Park YH; Jung SC; Ku BG; Jang GC; Shin S; Lee SI; Lee JM; Shin SJ, Serological tests in canine brucellosis., *RDA Journal of Agricultural Science, Veterinary*. Korea. 1994, 36: 2, 614-621; .
30. Neculescu M; Sarca M; Catana N; Staicu L., *Brucella canis* infection: diagnostic methods and reagents Studies and researches in veterinary medicine. *Journal of the Pasteur Institute Romania*. 1995, 3: 62-64; .
31. Nicoltti P., Further Studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. *Compendium Small Animal*, 13, 944-946, 1991.
32. Orduña A., Lorenzo B., Abad R., Rodríguez Torres A., Jornadas Internacionales sobre Brucelosis, *Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, España*, 1994.
33. Palmer MV; Cheville NF. Effects of oral or intravenous inoculation with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in Beagles. *American Journal of Veterinary Research*. 1997, 58: 8, 851-856; .
34. Palmer M.V., Olsen S.C., Gilsdorf M.J., Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB 51, *AJVR*, Vol. 57, No. 11, 1996.
35. Reeves P., Hobbs M., Valvano M., Skurnik M., Whitfield Ch., Coplin D., Kido N., Klena J., Maskell D., Raetz Ch., Rick P., Bacterial Polysaccharide Synthesis and Gene Nomenclature., *Trends in Microbiology*, Vol 4, No. 12, pp 495-502, 1996.

36. Rezaei Sadaghiani R; Zowghi E; Marhemati Khamene B; Mahpeikar HA: *Brucella melitensis* infection in sheep-dogs in Iran. Archives de l'Institut Razi. 1996, No. 46-47, 1-7; .
37. Ruiz Castañeda M., Brucelosis, P.M.M., México, D.F., 1986.
38. Sangari F., Agüero J., Molecular Basis of *Brucella* Pathogenicity: an Update, Sociedad Española de Microbiología, España, 1996.
39. Srinivasan VK Nedunchelliyan S; Venkataraman KS., Usefulness of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of *Brucella abortus* infection in dogs. Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases. 1992, 13: 1-2, 58-60; .
40. Srinivasan VK; Nedunchelliyan S; Venkataraman KS., Seroepidemiology of canine brucellosis in Madras city. Indian Veterinary Journal. India. 1992, 69: 11, 978-980; .
41. Srinivasan VK; Nedunchelliyan S; Venkataraman KS., Prevalence of canine brucellosis in urban and rural areas of Tamilnadu., Indian Journal of Veterinary Medicine. , India. 1992, 12: 1, 39; .
42. Stevens M.G., et. al., Immune and Pathologic Responses in mice Infected with *Brucella abortus* 19, RB 51, or 2308, Infect. Immun., Vol. 62, No. 8, pp 3206-3212, 1994

43. Talebkhan GM; Firoozi S; Nowrouzian I., The serological survey of *Brucella abortus* and *B. melitensis* in shepherd dogs on farms in Mashhad [Iran]. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. 1997, 51: 3-4, ar55-ar63; .
44. Taylor JP; Perdue JN., The changing epidemiology of human brucellosis in Texas, 1977-1986. American Journal of Epidemiology. 1989, 130: 1, 160-165; .
45. Thanappa Pillai M; Nedunchelliyar S; Raghavan N; Thanappapillai M., Brucellosis in a dog caused by *Brucella suis* biovar I in Madras. Cheiron. 1990, 19: 2, 97-98.
46. Tian Q (et-al)., Report of *Brucella canis* and *Brucella abortus* in raccoon dogs. Maopi Dongwu Siyang. 1990, No. 3, 42-44.
47. Vázquez N.J., Diagnóstico de la brucelosis canina (*B. canis*) y preparación de antígenos rugosos, En: Diagnóstico de Brucelosis Animal, INIFAP, 2000, 167-173.