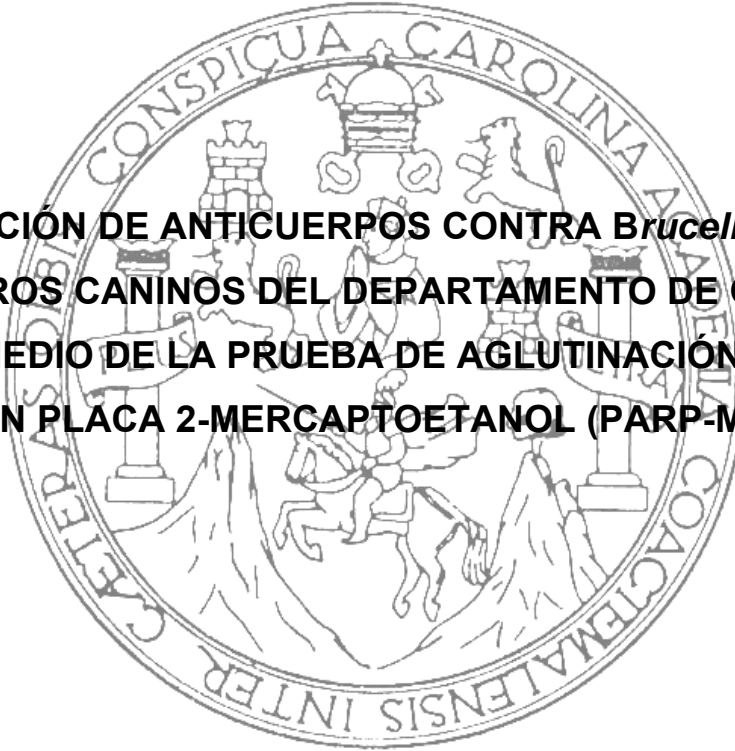


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella canis* EN  
5 CRIADEROS CANINOS DEL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA  
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA  
EN PLACA 2-MERCAPTOETANOL (PARP-ME)”**

**JUAN PABLO DEL AGUILA PADILLA**

**GUATEMALA, FEBRERO DE 2007**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella canis* EN  
5 CRIADEROS CANINOS DEL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA  
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA  
EN PLACA 2-MERCAPTOETANOL (PARP-ME)”**



**TESIS**  
**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**POR**  
**JUAN PABLO DEL AGUILA PADILLA**

**AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MEDICO VETERINARIO**

**GUATEMALA, FEBRERO DE 2007**

**JUNTA DIRECTIVA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

<b>DECANO</b>	<b>Lic. Zoot. MARCO VINICIO DE LA ROSA MONTEPEQUE</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Dr. M.V. MARCO VINICIO GARCÍA URBINA</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>Dr. M.V. YERI EDGARDO VÉLIZ PORRAS</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>Dr. M.V. MsC. FREDY GONZÁLEZ GUERRERO</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>Dr. M.V. EDGAR BAILEY</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>Br. YADYRA ROCIO PÉREZ FLORES</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>Br. JOSE ABRAHAM RAMÍREZ CHANG</b>

**ASESORES**

**Med. Vet. JACQUELINE ESCOBAR MUÑOZ**

**Med. Vet. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS**

**Med. Vet. EDGAR DAVID LOAIZA DE PAZ**

**HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR**

**EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE  
LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, PRESENTO A  
CONSIDERACION DE USTEDES EL  
TRABAJO DE TESIS TITULADO:**

**“DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella canis* EN  
5 CRIADEROS CANINOS DEL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA  
POR MEDIO DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA  
EN PLACA 2-MERCAPTOETANOL (PARP-ME)”**

**QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD  
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA COMO REQUISITO PREVIO  
A OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE**

**MÉDICO VETERINARIO**

## **ACTO QUE DEDICO**

- A DIOS**                      **Por haberme dado la vida**
- A MIS ABUELOS**            **Por haber hecho de mis padres lo que son**
- A MIS PADRES**            **Ya que gracias a sus consejos me guiaron a ser lo que soy, y por enseñarme con ejemplos, lo que significa ser padre y madre**
- A MIS HERMANOS**        **Por su apoyo y darme la oportunidad de ver en ellos, los éxitos cosechados a través de una carrera profesional**
- A MIS TIOS**                **En especial al Dr. M.V. Carlos del Aguila Bernasconi, por ser siempre la fuente de inspiración durante todos estos años**
- A MIS PRIMOS**            **Por apoyarme a lo largo de mi carrera profesional**
- A MIS SOBRINOS**        **Por todo el cariño y momentos compartidos**
- A MI AMIGO**               **Victor Trangay (QEPD) por haber compartido tantos momentos conmigo y por ser mi apoyo desde el cielo**

## **TESIS QUE DEDICO**

**A: DIOS**

**A: MI PAÍS GUATEMALA**

**A: LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE  
GUATEMALA**

**A: LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**A MIS ASESORES: Dra. M.V. JACQUELINE ESCOBAR  
Dr. M.V. CARLOS CAMEY  
Dr. M.V. EDGAR LOAIZA**

**A MIS PADRINOS: Dr. M.V. MsC. CARLOS DEL AGUILA BERNASCONI  
Dr. M.V. SERGIO VELIZ  
Dr. M.V. MANUEL SAENZ CONTRERAS**

**A MIS CATEDRATICOS POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS Y  
EXPERIENCIAS**

**A MIS AMIGOS Dr. Manuel Saenz, Dr. Carlos Chete, Dr. Edgar  
Loaiza, Dra. Luz Garcia, Dr. Guillermo González,  
Dr. Luis Giron, Dr. Fernando Joachin, Dra.  
Carmen Sandoval, Ing. Carlos Sosa, Ing. Paty  
Arriola, Steve Ponce, Fernando Mijangos,  
Miguel de Leon, Enrique Alvarado, Asdrúbal  
Casasola, Ronald Valdez, Isabel Trangay, Jairo  
Granados, Orlando Santa Cruz, David Paz Solé,  
Mario Roberto Escobar, Hallvard Holtung.**



# INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1 Definición	3
3.2 Historia	3
3.3 Distribución Geográfica	4
3.4 Etiología	4
3.5 Transmisión	5
3.6 Patogenia	6
3.7 Signos Clínicos	7
3.7.1 En la perra	8
3.7.2 En el perro	9
3.8 Lesiones	10
3.9 Inmunidad	11
3.10 Diagnóstico	12
3.10.1 Diagnóstico bacteriológico	12
3.10.1.1 Características de cultivo	14
3.10.2 Diagnóstico serológico	14
3.10.2.1 Pruebas de rutina	15
▪ Prueba de aglutinación rápida en placa	15
▪ Prueba de aglutinación rápida en placa 2-ME	15
▪ Seroaglutinación en tubo	16
▪ Seroaglutinación en tubo 2-ME	16



3.10.2.2	Pruebas confirmativas	17
▪	E.L.I.S.A.	17
▪	PCR	17
▪	Inmunodifusión en Agar Gel	17
▪	Fijación del complemento	18
3.11	Tratamiento	18
3.12	Prevención y Control	19
3.12.1	Mascotas	20
3.12.2	Criaderos	20
3.12.2.1	Eliminación de animales infectados	22
3. 13	Impacto en Salud Pública	23
3. 13. 1	La enfermedad en el humano	23
3. 13. 2	Sintomatología	25
3. 13. 3	Prevención	25
3. 13. 4	Diagnóstico	26
3. 13. 5	Tratamiento	26
IV.	MATERIALES Y METODOS	27
4.1	Recursos	27
4.1.1	Recursos humanos	27
4.1.2	Recursos de laboratorio	27
4.1.3	Recursos de campo	27
4.1.4	Recursos de tipo biológico	28
4.2	Localización geográfica	29

4.3	Métodos	30
4.3.1	Selección de criaderos	30
4.3.2	Recolección, procesamiento y almacenamiento de las muestras de caninos	30
4.3.3	Procedimiento de PARP-ME	31
4.4	Análisis estadístico	32
4.4.1	Cálculo de porcentaje	32
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
VI.	CONCLUSIONES	35
VII.	RECOMENDACIONES	36
VIII.	RESUMEN	37
IX.	BIBLIOGRAFIA	38
X.	ANEXOS	45
	Boleta de campo para el diagnóstico serológico de <i>Brucella canis</i>	46
	Boleta de laboratorio para diagnóstico de <i>Brucella canis</i>	47
	Ubicación de las 5 regiones geográficas para la selección de los criaderos caninos	48
	Ubicación geográfica de los 5 criaderos caninos muestreados	49
	APENDICES	68
	Respuesta inmune de perros a bacterinas inactivadas de <i>Brucella canis</i>	69
	Respuesta de caninos a la vacunación con la variante atenuada SM de <i>Brucella canis</i>	70
	Pruebas serológicas usadas para la detección de anticuerpos contra <i>Brucella canis</i>	71

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1</b>	Distribución general de resultados de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	50
<b>CUADRO 2</b>	Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	52
<b>CUADRO 3</b>	Distribución por criadero de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	58
<b>CUADRO 4</b>	Distribución por origen de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	60
<b>CUADRO 5</b>	Distribución por raza de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	62
<b>CUADRO 6</b>	Distribución por sexo de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	64
<b>CUADRO 7</b>	Distribución por edad de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	66

## INDICE DE GRAFICAS

<b>GRAFICA 1</b>	Distribución general de resultados de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	51
<b>GRAFICA 2</b>	Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006: Criadero "A"	53
<b>GRAFICA 3</b>	Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006: Criadero "B"	54
<b>GRAFICA 4</b>	Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006: Criadero "C"	55
<b>GRAFICA 5</b>	Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006: Criadero "D"	56
<b>GRAFICA 6</b>	Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006: Criadero "E"	57

<b>GRAFICA 7</b>	Distribución por criadero de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	59
<b>GRAFICA 8</b>	Distribución por origen de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	61
<b>GRAFICA 9</b>	Distribución por raza de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	63
<b>GRAFICA 10</b>	Distribución por sexo de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	65
<b>GRAFICA 11</b>	Distribución por edad de los caninos muestreados contra <i>Brucella canis</i> por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006	67

## I. INTRODUCCION

Es notable que algunas enfermedades bacterianas que afectan comúnmente a caninos, tales como Brucelosis y Leptospirosis, a pesar de los avances en tecnología e investigación de las últimas décadas, no ha sido posible controlarlas o combatirlas con vacunas seguras y efectivas, por lo que su control depende exclusivamente de la higiene, conocimiento de modos de transmisión y de factores epidemiológicos. Como lo señala el Dr. L. E. Carmichael en su *“Perspectiva personal de las enfermedades infecciosas caninas”, las enfermedades bacterianas, como la Leptospirosis, Brucelosis y el Complejo de la tos de las perreras, son de suma importancia y se necesita en gran medida que se continúe su investigación, debido al remarcable hecho de que ya se han controlado la mayoría de enfermedades caninas, principalmente las virales, por lo que el incentivo por la investigación canina ha disminuido seriamente en las ultimas décadas.*

Una de estas enfermedades con propiedades zoonóticas, la Brucelosis canina, producida por la bacteria *Brucella canis*, es la causa más común de aborto infeccioso en perras y se caracteriza por causar aborto tardío en perras, epididimitis en machos e infertilidad en ambos; siendo transmitida principalmente por material placentario abortado y descargas vaginales, por lo que la probabilidad de infección aumenta considerablemente en lugares con altas densidades caninas en lugares confinados, siendo uno de ellos los criaderos caninos, los cuales últimamente se han popularizado debido al auge de las exposiciones caninas tanto a nivel nacional como internacional, lo que ha llevado a la importación de reproductores de alto valor genético y que actualmente están siendo cruzados con reproductores guatemaltecos sin que existan controles serológicos para ambos, lo cual certifica la ausencia de enfermedades infecciosas.

Como lo recomiendan Azañon Robles (1980) y Gutiérrez Barberena (2001) en sus estudios sobre Brucelosis canina en Guatemala, que debido a sus características epidemiológicas y la importancia de la misma en los lugares destinados a la reproducción, es de suma importancia realizar dicho estudio en criaderos caninos, por lo que el presente estudio tiene como objetivo determinar el porcentaje de caninos seropositivos a Brucelosis canina en criaderos caninos del departamento de Guatemala por medio de la prueba PARP-ME y sentar así, las bases para futuras investigaciones.

## II. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL:

- Detectar la presencia de anticuerpos contra *Brucella canis* en 5 criaderos caninos del departamento de Guatemala.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar si existen animales seropositivos a *Brucella canis* en los criaderos caninos muestreados en el presente estudio.
- Establecer si existe relación en la detección de anticuerpos contra *Brucella canis* según el sexo, edad, raza y perros nacionales e importados en los criaderos caninos a estudiar.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 DEFINICION

La brucelosis canina es una antropozoonosis de distribución mundial de curso subagudo o crónico, caracterizada por una bacteremia de larga duración con presentación clínica o subclínica afectando principalmente los sistemas músculo esquelético y reproductivo, siendo la causa más común e importante de aborto infeccioso canino en criaderos, y en menor grado en mascotas. (21, 49)

#### 3.2 HISTORIA

Su presencia fue detectada en el año de 1966 cuando Carmichael y Bruner confirman problemas de infertilidad y aborto en criaderos de raza Beagle de Estados Unidos; posteriormente se logra su aislamiento en 1968 a partir de tejidos fetales y descargas post-aborto. Los organismos aislados presentaron signos semejantes a los del género *Brucella*, siendo linfadenitis generalizada, aborto posterior a los 50 días de gestación y prolongada descarga vaginal después del mismo, los cuales se corroboraron posteriormente por estudios bacteriológicos y serológicos. (7, 12, 13, 16, 21, 22, 37)

Carmichael y Bruner proponen el nombre de *Brucella canis* y su inclusión dentro del género *Brucella* en el año de 1968, el cual fue aceptado por el subcomité de taxonomía en *Brucella* de la *International committee on systematics of Prokaryotes* -ICSP- publicado para su validez en la “Lista de aprobación de nombres bacterianos” en el año de 1980. En 1994 se clasificó al género como gérmenes de riesgo nivel III (originada por agentes patógenos de origen animal, causantes de enfermedad en humanos de difícil diagnóstico y sin protocolo de tratamiento). (21, 26, 35) No es objeto de reporte obligatorio por parte de la Oficina Internacional de Epizootias – OIE –<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Del Aguila Bernasconi, C. 2005. Datos técnicos sobre brucelosis. Guatemala, Laboratorios Veterinarios –LAVET–. (Comunicación personal).



### 3.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA

A pesar de que la enfermedad se considera de distribución mundial no se conoce su prevalencia en la mayoría de países, pero se ha encontrado prácticamente en todos los países en los que se ha investigado; reportándose en América, Japón, China, España, Italia, Alemania, Gran Bretaña, Francia, Madagascar. Las estimaciones provenientes del sur de EEUU y Japón indican un 7-8% en perros callejeros. (1, 16, 22, 26)

González et al. (2004) encontraron en un estudio realizado en la Universidad Autónoma de México un 42.8% de perros seropositivos tanto en animales con problemas reproductivos como de tipo asociado a brucelosis canina.

### 3.4 ETIOLOGIA

*Brucella canis* es una bacteria intracelular, Gram negativa, inmóvil, con forma filamentosa y un tamaño de 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  por 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , cuya envoltura celular está compuesta por una membrana citoplasmática interna rodeada de la capa rígida de peptidoglicano y una membrana externa compuesta por fosfolípidos, proteínas y lipopolisacárido endotóxico (LPS), compuesta a su vez únicamente por una parte lipídica. (16, 21, 30) Al igual que *Brucella ovis* carecen de la cadena "O" en el LPS, por lo que se clasifican como brucelas de "tipo rugoso". (22)

El LPS es el responsable de la reacción antígeno-anticuerpo, sin embargo, el LPS-R posee reacciones cruzadas con otras bacterias como *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, ciertas cepas de *Staphylococcus* y de *Pasteurella multocida*. (7, 26, 31, 39)

### 3.5 TRANSMISION

*Brucella canis* posee un número limitado de huéspedes siendo las únicas especies infectadas en forma natural, el perro y los cánidos silvestres. (16, 25)

Las infecciones naturales ocurren más comúnmente después de la ingestión de materiales placentarios contaminados o de fetos abortados, descargas vaginales de perras infectadas que se encuentran en celo o que abortan, y durante el apareamiento. (1, 13, 16, 33, 37) Las secreciones al momento del aborto pueden contener hasta 1,010 microorganismos/ml, estimándose que la dosis infectiva mínima puede estar cercana a 10<sup>6</sup> microorganismos. (22, 25)

En los machos que presentan lesiones testiculares, los fluidos seminales o prostáticos actúan como contaminantes de la orina a partir de la tercera a onceava semana después de iniciada la infección, llegando a contener hasta 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup> microorganismos/ml. También se ha aislado en raras ocasiones a partir de leche proveniente de perras infectadas, por lo que no se descarta esta vía de transmisión. (16, 22, 25, 33)

Contaminación iatrogénica se da por transfusiones sanguíneas y uso de equipo contaminado (endoscopio vaginal, equipo de inseminación artificial y cirugía) el cual en condiciones de alta humedad, bajas temperaturas y ausencia de luz solar, puede esparcir al microorganismo. (26, 33)

En estudios de laboratorio realizados por Carmichael y Kenney (1968) probaron exitosamente la vía intravenosa, subcutánea, oral, conjuntival, intravaginal y por contacto, como vía de transmisión para *Brucella canis*. La dosis de inoculación usada fue de aproximadamente 10<sup>6</sup> organismos, excepto en la transmisión por contacto, en donde los perros fueron expuestos a perras que habían abortado recientemente.

Carmichael y Kenney (1968) demostraron la transmisión vertical de *Brucella canis*; en dos instancias perras infectadas parieron cachorros normales a simple vista y otros débiles. Los cachorros de una de las perras presentaron bacteremia a la semana de edad; tres de cinco cachorros de la otra perra murieron a los dos días de edad y la bacteria fue aislada a partir de sangre y órganos internos, los cachorros que sobrevivieron estaban normales pero permanecieron bacterémicos hasta el cuarto mes en que fueron sacrificados.

### 3.6 PATOGENIA

Independientemente de la puerta de entrada, los linfocitos, las células plasmáticas y las células reticulares son las principales células afectadas, siendo la reacción tisular básica la hiperplasia de células reticulares de los órganos linfoides y la consecuente formación de granulomas en órganos como nódulos linfáticos, bazo, hígado, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, vesículas seminales y médula ósea. (13, 21, 22)

El macrófago es la célula encargada de fagocitar a las bacterias pero ella misma se encarga de transportarlas a los órganos genitales y nódulos linfáticos regionales: retrofaríngeos si la ruta de entrada fue oral e inguinales e iliacos si fue genital, en donde se adaptan al ambiente ácido y persisten a nivel intracelular, principalmente en el retículo endoplásmico rugoso. Se produce una linfadenopatía seguida por una bacteremia que empieza aproximadamente entre la 1er y 3er semana post-infección, y que puede ser detectable de dos a cuatro semanas post-infección y puede durar entre 6 a 64 semanas. (8, 13, 22, 23, 25, 31, 33)

Carmichael en un estudio realizado en 1970, reporta que de un grupo de 12 caninos, 6 de ellos persistieron bacterémicos 12 meses después de la inoculación oral con *Brucella canis*.

Los microorganismos probablemente invaden al feto vía placenta, sin embargo, la alta concentración de bacterias en los fluidos amnióticos y la presencia de leucocitos en el lumen de estómago e intestinos de los fetos abortados, sugiere que la infección fetal ocurre como resultado de la ingestión de fluido amniótico, la cual finalmente produce el aborto. (13)

En perras que han abortado, las brucelas han estado presentes en grandes cantidades en las descargas vaginales (uterinas), y como se ha mencionado, las descargas vaginales continúan por varias semanas, siendo éste material excretado la fuente más común de transmisión hacia otros animales. (13)

Carmichael (1970) en un estudio reporta que a la necropsia de perras no preñadas, no encontró cantidad considerable de *Brucella canis* a nivel de útero, sin embargo, en perras preñadas la placenta fue el lugar mas común de infección.

Carmichael en otro estudio realizado en 1970 con 12 caninos, reporta que dos de ellos murieron 2 semanas después de haberlos infectado vía oral con *Brucella canis*, y a la necropsia encontró bacterias en varios tejidos diseminados por todo el organismo, sin embargo, las encontró en mayor cantidad en los tejidos ricos en células retículo endoteliales (nódulos linfáticos, hígado y bazo), y en los machos sexualmente maduros a nivel de próstata y epidídimo.

### **3.7 SIGNOS CLINICOS**

A pesar de la infección sistémica, los perros adultos rara vez desarrollan enfermedad grave debido a la virulencia relativamente reducida de *Brucella canis*, considerándose más su mortalidad perinatal, y que aunado a la inespecificidad de los signos clínicos se dificulta su diagnóstico a partir de ellos. (1, 22, 25, 37, 51)

En caninos es una causa importante de problemas reproductivos en todas las razas y edades, causando anestro, muerte embrionaria, aborto, prostatitis y atrofia testicular entre otros signos, evolucionando hasta la incapacidad reproductiva de machos y hembras; igualmente se asocia con pérdidas económicas importantes a nivel de criaderos principalmente por la “tormenta” de abortos, en donde los individuos portadores actúan como agentes diseminadores de la enfermedad. (7, 12, 13, 21, 37, 39, 49)

Los signos no específicos incluyen letargia, pérdida de libido, envejecimiento prematuro, pérdida de brillo y sequedad del pelaje, cambios en comportamiento como indiferencia al medio, anorexia; y por ser una enfermedad insidiosa, los signos clínicos no son los adecuados para establecer el diagnóstico, sobre todo en animales prepúberes y no gestantes, dependiendo más de pruebas serológicas y aislamiento bacteriológico. (1, 16, 21, 33, 37)

No se ha observado pirexia, incluso cuando se han inoculado grandes cantidades de microorganismos a nivel parenteral ( $10^{10}$  microorganismos). (13)

En ambos sexos, otros signos clínicos se dan de acuerdo con el sitio de las localizaciones secundarias, siendo en los discos intervertebrales (discoespondilitis), bulbo ocular (uveítis) y riñón (glomerulonefritis). (16, 26, 37, 38)

### **3.7.1 EN LA PERRA**

En las hembras no gestantes la enfermedad es clínicamente inaparente, siendo casi el único signo el aborto, que ocurre en un 75% entre los días 45 y 55 de gestación, además de parir cachorros muertos o débiles que mueren en las primeras 24 a 48 horas, sin embargo, cachorros infectados *in útero* pueden sobrevivir y desarrollar hipertrofia de nódulos linfáticos como único signo de enfermedad. (1, 12, 13, 16, 25, 30, 37, 49)

El aborto o la muerte embrionaria pueden ocurrir repetidamente o presentarse partos y camadas aparentemente normales después de un aborto. No existen diferencias en cuanto a susceptibilidad por edades en hembras, ya que el aborto ocurre tanto en perras jóvenes (1 año) como adultas (10 años), presentándose con mayor frecuencia entre los 2 y 4 años, correspondiendo a la edad óptima de reproducción. (1, 13, 16, 21, 22, 26, 33, 37, 38, 51)

Las descargas vaginales fétidas persistentes son un hallazgo común y duran entre 1 y 6 semanas, variando en cantidad, color y consistencia; pudiendo llegar a tener una carga viable de microorganismos de  $10^{10}$ /ml. (7, 8, 12, 13, 21, 33, 37, 49, 51) No se ha observado retención placentaria. (22, 26)

### **3.7.2 EN EL PERRO**

En el macho el principal signo es la epididimitis de uno o ambos testículos, e infertilidad. También se puede encontrar prostatitis, orquitis, dermatitis y edema a nivel escrotal. Existe hipertrofia y tumefacción del epidídimo seguido de atrofia testicular, siendo hallazgos comunes en perros naturalmente infectados o experimentalmente inoculados. Las reacciones escrotales se hacen manifiestas de 3 a 5 semanas post-infección, evidenciándose dolor a la palpación testicular y epididimal, siguiendo un curso degenerativo y atrófico a nivel testicular (uni o bilateral). (1, 7, 8, 13, 16, 21, 22, 25, 26, 33, 37, 38, 39, 51)

En México, González et al. (2004) determinaron que los principales problemas reproductivos en perros seropositivos a *Brucella canis* son epididimitis, orquitis y en menor proporción degeneración testicular, infertilidad y dermatitis escrotal. El principal signo no relacionado con problemas reproductivos es la discoespondilitis y en menor proporción la uveítis anterior y artritis.

Algunos perros con atrofia testicular son fértiles, otros manifiestan disminución del líbido en grado variable y en caso de atrofia testicular bilateral, generalmente son estériles. (21, 33) Debido a que al momento del daño testicular por *Brucella canis*, existe liberación de autoantígenos desarrollados durante la vida fetal que son percibidos como extraños por el sistema inmune del adulto, se produce una enfermedad autoinmune con el consecuente desarrollo de orquitis, encontrándose a nivel sanguíneo, autoanticuerpos contra los espermatozoides los que estimulan a su vez, la producción de autoanticuerpos tipo IgG o IgA, causantes de la aglutinación e inmovilización de los espermatozoides, produciendo finalmente la infertilidad en el macho. (8, 16, 52)

En el espermograma, en la fase aguda se observan defectos morfológicos de cabeza, cuerpo y cola, colas desprendidas, disminución del volumen de eyaculado, abundantes células inflamatorias (neutrófilos y mononucleares); y en los casos crónicos se encuentran aglutinados o fagocitados con disminución de motilidad y oligospermia, e incluso, azoospermia. (16, 22, 25)

En un estudio realizado en México, Flores-Castro y Segura (1975) infectaron a 4 perros con una suspensión intravenosa de *Brucella canis*, los cuales presentaron signos clínicos de la enfermedad entre las 5ta y 6ta semana, consistiendo en orquitis bilateral y epididimitis.

### **3.8 LESIONES**

El hallazgo macroscópico más constante es la hiperplasia de nódulos linfáticos. En la necropsia se encuentran hallazgos anormales como edema, hiperemia y hemorragias en el área subcutánea del abdomen. Microscópicamente se puede encontrar infiltrado mononuclear en cualquier órgano donde el microorganismo haya colonizado. (22) A nivel testicular las lesiones corresponden a prostatitis, atrofia testicular y epididimitis intersticial, que puede llegar a fibrosis, pero a diferencia de la brucelosis de otras especies, los conductos no suelen obliterarse ni estrecharse. En casos crónicos se observa hipertrofia del epidídimo, especialmente a nivel distal. (37)

Cuando ocurre aborto se observa placentitis necrótica focal y vasculitis necrotizante en próstata, escroto, prepucio y vulva. (22, 25, 37)

### 3.9 INMUNIDAD

La infección induce respuestas inmunes principalmente mediadas por células y que dependen de la activación de los macrófagos, las cuales varían por factores tales como patogenicidad de la cepa infectante, edad, estado nutricional, tratamientos previos con antibióticos y estado inmune del huésped. (21)

La mayor actividad que ejercen los macrófagos para eliminar a la bacteria se debe a un tipo de interleucina, la linfoquina, que es liberada por los Linfocitos T específicos, una vez que son reconocidos por el antígeno bacteriano y los componentes del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie del macrófago. (21)

Los anticuerpos circulantes también desempeñan cierto papel en la inmunidad pero existe poca correlación entre los títulos de anticuerpos y el grado de resistencia. Después de la infección, aumentan las IgM (detectables en las primeras semanas post-infección empezando a disminuir a los 3 meses) y la IgG comienza a aumentar en la segunda semana de enfermedad y dura por lo menos un año en pacientes no tratados, disminuyendo hacia el sexto mes si existe tratamiento. Si hay aumento persistente, se atribuye a la presencia de microorganismos intracelulares viables en tejido retículoendotelial ó focos de infección. (21)

Carmichael en un estudio realizado en 1970 reporta que 5 caninos inoculados vía oral con *Brucella canis* y mantenidos en unidades de aislamiento durante 2 años, fueron inmunes a la re-inoculación. Su inmunidad fue puesta a prueba vía oral con una concentración de  $10^7$ - $10^8$  organismos viables, al menos 3 meses después de que la bacteremia inicial había cesado y los títulos aglutinantes de anticuerpos habían declinado a 1:50 o menos. Ninguno de los caninos re-expuestos desarrollaron bacteremia y los títulos de aglutininas no incrementaron significativamente. La bacteria no fue aislada cuando los tejidos de estos perros fueron examinados bacteriológicamente en la necropsia.



### 3.10 DIAGNÓSTICO

A pesar del mejoramiento de los métodos de diagnóstico, el más preciso y definitivo está representado por el cultivo y aislamiento de la bacteria, sin embargo, ninguna técnica de laboratorio se encuentra estandarizada, siendo la serología el método más usado por su facilidad en la obtención de resultados y su costo; a pesar de la obtención de resultados falsos positivos debido a la reacción cruzada entre varias especies de bacterias con el antígeno lipopolisacárido (LPS) de *Brucella canis*. (7, 13, 16, 21, 25, 26, 51)

Los valores hematológicos y bioquímicos no están alterados o son inespecíficos, siendo la hiperglobulinemia con hipoalbuminemia concomitante el hallazgo más constante en casos crónicos. (25)

Independientemente del método a utilizar se deben de catalogar los casos clínicos como casos sospechosos para machos con orquitis y/o epididimitis, hembras que abortan dos semanas antes de término y fallas en el apareamiento; y casos confirmados en caso de manifestaciones clínicas compatibles con cultivo positivo o serología positiva. (51)

#### 3.10.1 DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El cultivo es el único método diagnóstico definitivo para resolver las diferencias serológicas, siendo la sangre la mejor fuente para aislar el microorganismo, utilizándose sangre con anticoagulante, como heparina y citrato, y no con EDTA ya que inhibe el crecimiento de *Brucella canis*. (12, 25, 26, 38, 51)

La presencia del microorganismo en sangre se puede detectar a partir de la tercera a cuarta semana post-infección y puede durar hasta 1 año o más en el 80% a 100% de los animales, presentándose de una forma intermitente e incluso los animales crónicos pueden llegar a ser persistentemente no bacterémicos. El hemocultivo permite el diagnóstico de infecciones tempranas, teniendo en cuenta que en las primeras 4 semanas post-infección las pruebas serológicas y los cultivos de semen y orina son aún negativos. (22, 39)

Los tejidos ideales para el aislamiento son hígado, bazo, próstata, nódulos linfáticos, orina y las descargas vaginales; y con menos frecuencia se reportan aislamientos a partir de semen, leche y calostro. Tejidos placentarios y fetales poseen alta concentración del microorganismo tales como pulmón, bazo, hígado, nódulos linfáticos, sangre y principalmente estómago e intestinos, sugiriendo que la infección fetal puede ocurrir por la ingesta de fluido amniótico. (7, 16, 21, 25, 33, 47)

Los hisopados vaginales son útiles únicamente cuando existe descarga vaginal. A partir de semen se tiene la mayor sensibilidad entre la tercera y sexta semana post-infección, ya que a partir de ese período el número de microorganismos empieza a disminuir hasta llegar a la semana sesenta donde el resultado será negativo aún cuando el animal continúe infectado, sin embargo, el éxito de aislamiento a partir de la eyaculación manual no es muy exitoso. (7, 8, 22)

El éxito del aislamiento depende de la viabilidad del microorganismo y de la fase de infección, por lo que un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección, debiéndose hacer una colecta de 3 muestras consecutivas con al menos 24 horas de intervalo. (33, 39)

Dentro de los primeros estudios realizados por Carmichael y Kenney (1968) donde se demuestra la relación entre los títulos aglutinantes de *Brucella canis* y su frecuencia de aislamiento en sangre en un criadero con 166 caninos, lograron aislar la bacteria en 55 caninos de 57 que poseían títulos de 1:100 o más; en 3 caninos de 13 con títulos de 1:50 y en 1 canino de 10 con títulos de 1:25; y no lograron aislar la bacteria en 86 animales serológicamente negativos.

### 3.10.1.1 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO

El crecimiento óptimo se da en medios como Agar Brucella, Agar Triptosa ó Soya Tripticasa con ambiente aerobio ya que el CO<sub>2</sub> es inhibitorio para la bacteria, formando colonias pequeñas. (7, 22) Dicho crecimiento se logra a 37°C y a las 36-48 horas ya son visibles las colonias cambiando a altamente mucoides entre los siguientes 5 a 7 días, las cuales poseen un tamaño de 1 a 1.5 mm. (7)

No crece en medios selectivos como el Agar McConkey, ya que la membrana externa de la bacteria no la protege contra los agentes hidrófobos contenidos en dichos medios, tales como sales biliares, detergentes o ciertos colorantes. (26)

### 3.10.2 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Debido a que *Brucella canis* y *Brucella ovis* se encuentran en fase rugosa privadas de la cadena "O" del antígeno superficial lipopolisacárido –LPS– que caracteriza a las brucelas en fase lisa (*Brucella abortus*, *Brucella suis* y *Brucella melitensis*) se debe contar con el antígeno específico ya que no posee reacción cruzada con ellas, lo que junto al limitado impacto económico y zoonótico que posee en relación a otras brucelas, son pocas las pruebas que se han desarrollado. (1, 8)

La infección por *Brucella canis* produce anticuerpos que son detectables por pruebas serológicas a partir de la octava semana post-infección, debido a que la primera fase de la respuesta inmune predomina la IgM que va siendo paulatinamente superada por la IgG, la que es característica de enfermedad crónica. (22)

Los títulos aglutinantes en el humor acuoso son superiores a los del suero. (37) Los títulos serológicos son bajos cuando los cultivos sanguíneos son negativos. (49) Tratamiento previo con antibióticos puede producir resultados falsos negativos. (25)

Las pruebas serológicas más comunes que se realizan a nivel mundial son la prueba de aglutinación rápida en placa y la prueba de aglutinación en tubo. (21, 22)

### 3.10.2.1 PRUEBAS DE RUTINA

- Prueba de aglutinación rápida en placa – PARP –  
(Rapid slide agglutination test – RSAT–)

La fórmula original de esta prueba usa como antígeno a *Brucella ovis*. Se utiliza un antígeno concentrado para pruebas en placas o láminas, usado a gran escala en la mayoría de países del mundo debido a su ventaja de ser rápida, sencilla y económica, lo que permite su uso masivo. (16, 22)

Esta prueba cuando da resultado negativo es fehaciente, pero cerca del 40% de las muestras positivas son falsas. (16)

- Prueba de aglutinación rápida en placa 2-Mercaptoetanol – PARP-ME –  
(2-ME Rapid slide agglutination test – 2-ME RSAT –)

Esta prueba puede usar tanto antígeno de pared celular de *Brucella canis* como de *Brucella ovis* para la brucelosis canina, ya que este último reacciona en forma cruzada con el antígeno lipopolisacárido (LPS) de *Brucella canis*. Actualmente se usa antígeno *Brucella canis* M<sup>-</sup>, aumentando la especificidad. (16)

Es una prueba rápida, fácil y muy sensible reportándose un 1% de falsos negativos. Nos proporciona resultados positivos a las 5-8 semanas post-infección hasta que el animal ya no posee bacteremia. La reacción positiva es particularmente significativa cuando existen signos clínicos de la enfermedad. (16, 22)

La prueba con 2-Mercaptoetanol es selectiva detectando únicamente la presencia de IgG, aumentando con ello la especificidad de la prueba, ya que en las etapas tempranas de enfermedad predominan los anticuerpos IgM que son sensibles a la destrucción por el 2-ME, convirtiéndolos a subunidades debido a la reducción de los enlaces disulfuro por parte del radical tilo. Se debe tener en cuenta que al inicio de la infección solo se originan anticuerpos IgM, por lo que la prueba con 2-ME puede ser negativa. (16, 21, 22, 26)

En varios estudios el mayor porcentaje de resultados positivos corresponde a esta prueba frente a las demás utilizadas de forma rutinaria, aunque la persistencia de falsos positivos ha sido evidente por medio de todos los métodos utilizados. (21, 22) Los sueros con resultados positivos se recomiendan evaluarlos con AGID ó ELISA. (16)

- Seroaglutinación en tubo – SAT –  
(Tube agglutination test – TAT –)

Es el método más antiguo que se realiza. Se ha mantenido como prueba básica en los programas de control y erradicación debido a su fácil ejecución y los resultados uniformes obtenidos, economía y estandarización a nivel internacional. Sus inconvenientes son la de falta de sensibilidad en casos tempranos de enfermedad y la interpretación en caso de títulos aglutinantes bajos. Puede dar resultados negativos en las primeras etapas de infección y en infecciones crónicas. (16, 21, 22)

En Turkía, Akan y Sareyyüpoğlu (2000) demostraron que al usar 2-Mercaptoetanol en la prueba de aglutinación en tubo (TAT) eliminó en 39.1% los falsos positivos de dicha prueba, además de encontrar una similitud en 96.42% entre los resultados obtenidos con 2-Mercaptoetanol y ELISA.

- Seroaglutinación en tubo 2- Mercaptoetanol – SAT-2ME –  
(2-Mercaptoetanol-TAT – 2ME-TAT –)

Es una prueba muy similar a la PARP-ME ya que también utiliza al 2-Mercaptoetanol para aumentar su sensibilidad. Utiliza antígeno de pared celular y nos proporciona resultados positivos a las 5-8 semanas post-infección hasta que el animal ya no posee bacteremia. (16, 22) Es una prueba semicuantitativa, de mayor sensibilidad que la seroaglutinación en tubo pero con el inconveniente de proporcionar resultados falsos positivos. (16)

### 3.10.2.2 PRUEBAS CONFIRMATIVAS

- E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assays)

Prueba que utiliza antígeno de pared celular que permite cuantificar los anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA, siendo muy específica pero menos sensible que la seroaglutinación en tubo. Tiene elevado costo y su falta de estandarización en cuanto al tipo de antígeno hace difícil comparar los resultados de un laboratorio con otro, eliminando la posibilidad de discernir entre curación y evolución a cronicidad. (16, 22)

En estudios realizados por Hortnitzky y Cerrazón (1986) determinaron que la prueba es sensible y específica, y al compararla con PARP-ME y seroaglutinación en tubo, obtuvieron que ELISA es la más específica con un 95% de efectividad.

- PCR (Polymerase chain reaction)

Es un método *in vitro* que sintetiza secuencias definidas de enzimas de DNA, siendo rápido, sensible y específico para la identificación, ya que sintetiza *in vitro* secuencias específicas de DNA bacteriano. (22)

El PCR es útil para muestras de sangre, suero, leche y semen. En efecto la sangre es ideal para detectar la infección debido a la prolongada bacteremia característica de *Brucella canis*. (38)

En algunos trabajos se menciona ser de alta sensibilidad (100%) y especificidad (98.5%), de fácil y rápida ejecución, no obstante la interferencia de algunos elementos hemáticos se ha considerado un factor limitante de su sensibilidad. (20, 22)

- Inmunodifusión en Agar Gel (AGID, Agar gel inmunodifusión test)

Esta prueba usa antígeno de pared celular y todavía esta sujeta a falsos positivos. Cuando se utiliza proteína altamente específica se obtiene alta sensibilidad en detectar la infección. (16, 22)

Los anticuerpos pueden ser detectados de 1 a 2 semanas más temprano que con PARP-ME pero tiene dificultad en la interpretación de resultados y las reacciones de precipitación no específicas son bastante comunes. (16, 22)

- Fijación del complemento

Considerada como la más específica pero resulta muy laboriosa, complicada e intervienen muchos factores; además no se encuentra estandarizada a nivel mundial. (1)

### 3.11 TRATAMIENTO

Dada la ubicación intracelular de *Brucella canis*, la mayoría de autores coinciden en considerar poco efectivo el tratamiento debido al riesgo de infección crónica y posibles complicaciones. (8, 16, 20, 21, 25, 26, 33)

Se ha demostrado que *Brucella canis in vitro* es sensible a sulfonamidas, tetraciclinas, penicilinas, aminoglucósidos, macrólidos y particularmente sensible a penicilina-estreptomicina; sin embargo, *in vivo*, si bien es cierto que la bacteremia desaparece durante la administración de la terapia antibiótica, ésta reaparece una vez terminado el tratamiento. (16, 21, 26)

El tratamiento debe realizarse con un régimen de fármacos combinados donde se requiere que uno de los antibióticos tenga un grado adecuado de penetración celular, ya que ayudan a acortar el curso de la enfermedad, a disminuir la morbilidad y la incidencia de complicaciones; obteniéndose mejores resultados si la terapia empieza en etapas tempranas de la enfermedad, reportando Carmichael y Shin (1999) tasas de más del 80% de curación en criaderos, en donde los perros inicialmente diagnosticados como infectados eran sacrificados y los casos “tempranos” fueron tratados, aunque en general el tratamiento no está recomendado para perros de cría o cuando un seguimiento a largo plazo (3 meses) es improbable. (21, 22, 25)

Las fallas en el tratamiento son especialmente comunes en los machos infectados debido a que la bacteria se aloja a nivel de próstata y epidídimo. (16)

### 3.12 PREVENCIÓN Y CONTROL

Debido a la importancia económica de la enfermedad en criaderos por la pérdida de la capacidad reproductiva y el potencial zoonótico, se han hecho intentos por desarrollar una bacterina convincente que induzca inmunidad sin provocar respuesta serológica que interfiera con el diagnóstico, pero no se ha tenido éxito. (7, 8, 16, 30)

Los resultados obtenidos por Carmichael (1970), usando bacterinas de *Brucella canis* inactivadas con calor y formalina, no sugirieron inmunidad satisfactoria después de haber aplicado dos inoculaciones de bacterias suspendidas en solución salina ó bacterias suspendidas en mezclas de fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio ó gel de alginato de calcio. Las únicas bacterinas que estimularon la inmunidad fueron aquellas que consistían en organismos emulsificados con el adyuvante tipo Freund (emulsión de agua en aceite mineral). En muchas instancias los perros fueron considerados “inmunes”. (Ver Apéndices) (13)

En un estudio realizado por Carmichael (1970) con perros en diferentes estados reproductivos usando bacterinas atenuadas de *Brucella canis* variante SM (smooth-mucoid), no causaron el aborto de una perra que fue inoculada vía subcutánea con  $10^9$  organismos a los 30 días de gestación, naciendo los cachorros abacterémicos, aunque adquirieron bajos niveles de anticuerpos maternos, sin embargo, la perra desarrolló bacteremia que persistió durante 4 meses, así mismo, dos perros fueron inoculados vía intravenosa con  $6 \times 10^6$  organismos, los cuales no desarrollaron signos de epididimitis u orquitis durante un periodo de observación de 3 a 4 meses, observándose únicamente agrandamiento de nódulos linfáticos en forma moderada. (Ver Apéndices)



Actualmente el desarrollo de bacterinas está considerado como indeseable ya que las estudiadas confirieron sólo una moderada protección y los perros vacunados desarrollaron anticuerpos que confundieron el serodiagnóstico, por lo que la prevención de la infección y eliminación de perros infectados sigue siendo la principal estrategia de control en criaderos. (13, 16, 30)

### **3.12.1 MASCOTAS**

La decisión de tratar o de sacrificar al animal infectado, dependerá directamente del tipo de lesiones que tenga, cuidados de los propietarios para disminuir los riesgos de transmisión, seguimiento serológico que se le pueda llevar y la cronicidad de la enfermedad. Si se elige el tratamiento con terapia antibiótica, el animal deberá ser castrado y seguir el tratamiento con antibióticos, ya que así se reduce el riesgo de transmisión, no obstante, esta hipótesis no se ha comprobado experimentalmente y la castración no elimina a los microorganismos del organismo. (16, 22)

### **3.12.2 CRIADEROS**

Entendemos como criadero al *lugar físico especializado en criar animales que poseen descendencia fenotípica y genotípica de alta calidad en base a los estándares ideales de cada raza en particular, buscando siempre, la excelencia de sus ejemplares.* Debido a ello sólo deben adquirirse animales que provengan de criaderos declarados libres de brucelosis canina, requiriendo para ello, de pruebas serológicas anuales de todos los reproductores y el control serológico de todos los perros a introducirse en el criadero. Solamente animales comprobadamente no infectados deben destinarse a la reproducción. En EEUU las hembras en reproducción son comúnmente monitoreadas serológicamente antes del celo por la técnica RSAT. (16, 22, 33, 49)

Dos pruebas serológicas con 4 a 6 semanas de intervalo deben requerirse a todos los perros antes de introducirlos a un criadero. Las dos pruebas detectarán a perros que podrían estar incubando la enfermedad. Si una hembra aborta, deberá asumirse infección hasta que sea demostrado lo contrario. Las hembras que abortan deben ser aisladas y las perreras desinfectadas. Si el macho pierde interés por la monta o desarrolla anomalías testiculares o disminuye su fertilidad, deberá ser examinado para descartar brucelosis. (16, 22)

El tratamiento no se recomienda para perros de criaderos y donde los perros no puedan ser aislados y monitoreados con precisión después de la terapia con antibióticos. El tratamiento es caro por su larga duración y la curación difícil de lograr, especialmente en los machos crónicamente infectados por lo que cuando aparezca un animal positivo, no se recomienda el tratamiento sino su eliminación inmediata para reducir el contacto con secreciones infectadas, además de la evaluación serológica de todos los animales con intervalos de 8 a 12 semanas, ya que los perros portadores son los causantes de mantener la enfermedad. La supervivencia del microorganismo fuera del huésped es corta principalmente si la temperatura ambiental excede los 15°C. (21, 22, 33)

Se requieren cultivos de sangre repetidos y monitoreos serológicos por lo menos durante 3 meses post-tratamiento antes de que un perro pueda ser declarado negativo. La aparición de la infección después del cese del tratamiento con antibióticos es común, incluso si el microorganismo fue eliminado exitosamente. (16)

Las pruebas diagnósticas y la eliminación de los perros infectados son los únicos métodos comprobados para la erradicación de *Brucella canis* en criaderos infectados. Se debe intentar identificar la fuente de infección, desafortunadamente esto es raro debido a la renuencia de los criadores a admitir su culpabilidad. (16)

Los Médicos Veterinarios deben estar preparados para responder a las preocupaciones de los propietarios y para dar consejos, los cuales podrían variar de acuerdo a las circunstancias. La prevención es esencial para evitar el cuadro de infección en un criadero. Tan pronto como la brucelosis es detectada en un criadero, se deben implementar medidas rigurosas hasta que la enfermedad sea erradicada. Los criaderos infectados deben entrar en cuarentena aunque no hay regulaciones formales en la mayoría de países, lo que ha ayudado a una dispersión incluso a nivel internacional de la enfermedad. (16)

Se requiere de procedimientos adecuados de desinfección con hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70%, formaldehído, y compuestos de amonio cuaternario. (21, 33)

La cuarentena estricta, pruebas de laboratorio y la eutanasia de los animales infectados son los métodos necesarios para eliminar y prevenir el avance de la enfermedad cuando ésta es detectada en criaderos. Durante la cuarentena, cada animal debe ser mantenido en espacios separados para evitar la diseminación. La eutanasia de animales sospechosos es la segunda opción para minimizar el tiempo de infección. (33)

Resultados seropositivos en criaderos se relacionan con la ausencia de un programa de control para brucelosis canina y de registros reproductivos adecuados. (16, 22)

### **3.12.2.1 ELIMINACION DE ANIMALES INFECTADOS**

En los criaderos, es causante de grandes pérdidas económicas ya que si la enfermedad no es identificada rápidamente puede extenderse entre las demás hembras, llegando al 80% de casos de abortos, además de cierta inhabilidad para concebir perras infectadas catalogadas como infértiles, lo cual se relaciona con reabsorción embrionaria temprana hasta el día 45 de gestación sin signos externos llamativos. (13, 22, 25, 26) En criaderos afectados se ha observado una reducción de hasta 75% en el número de perros destetados con éxito, reduciendo con ello el porcentaje de cachorros por hembra por año. (33)

El único método eficaz comprobado para el control de la enfermedad es la identificación de los perros infectados a través de estudios serológicos, aislamiento de la bacteria y eutanasia de los caninos. (21, 49)

### **3. 13 IMPACTO EN SALUD PÚBLICA**

El hombre es susceptible a la infección de *Brucella canis* aunque en menor grado que a otras especies del género. Aunque se considera que la infección humana es poco frecuente incluso en países donde existe alta prevalencia en caninos, se evidencia su implicación zoonótica reportándose en 1967 el primer caso a nivel mundial, por lo que la Organización Mundial de la Salud –OMS– la clasificó de reporte obligatorio dentro de la categoría de enfermedades infecciosas de origen bacteriano relacionadas con salud ocupacional y de tipo profesional de notificación inmediata, y posteriormente la catalogaron como enfermedad de riesgo biológico nivel III. (1, 8, 16, 21)

En recién nacidos, la transmisión transplacentaria de anticuerpos de *Brucella canis* ha sido comprobada en humanos por Monroe et al (1975) y en perras por Carmichael y Kenney (1970).

#### **3. 13. 1 LA ENFERMEDAD EN EL HUMANO**

En humanos, la entidad se origina por contacto directo con caninos infectados a través de membranas mucosas, contaminación percutánea, accidentes biológicos o exposición accidental, produciéndose una entidad de carácter súbito y sintomatología inespecífica que hace difícil su diagnóstico y en el cual no desempeña ningún papel en el mantenimiento de la enfermedad en la naturaleza. (21)

Las personas con más riesgo son aquellas directamente vinculadas con el cuidado de animales en criaderos debido a la exposición con tejidos y fluidos reproductivos, considerándose una enfermedad de tipo ocupacional, principalmente en el rango entre 25-55 años, considerado el periodo de mayor actividad laboral; además de Médicos Veterinarios y personal de laboratorio. (8, 21, 22, 33)

La información existente sobre prevalencia e incidencia a nivel mundial es escasa y desde su aislamiento, investigadores de diversos países han confirmado su presencia, confirmándose su distribución mundial. (21)

Estudios realizados por Monroe et al. (1975) para determinar la prevalencia de anticuerpos en 4 grupos específicos de personas basados en la probabilidad de exposición, encontró que el 5.7% de recién nacidos poseían anticuerpos contra *Brucella canis*; el grupo con cierta probabilidad de exposición consistente en personas hospitalizadas, no hospitalizadas, trabajadores de hospitales y donadores de sangre, poseían un 67.8% de prevalencia; el grupo de alta exposición consistente en Médicos Veterinarios activos, obtuvo la segunda prevalencia más alta, siendo de 72.6% y el último grupo consistente en personas con fiebre de origen desconocido, obtuvieron la prevalencia más alta del estudio, siendo de 80.5%.

En un estudio realizado por Flores-Castro y Segura (1975) en México, en el cual evaluó 203 muestras de sueros provenientes de diferentes hospitales y laboratorios clínicos del país, encontró que el 13.3% (27) de las muestras poseían títulos iguales o superiores de 1:100.

Carmichael (1976) reporta que entre el descubrimiento de la bacteria en 1966 hasta el año de 1976, habían sido reportados 15 casos de *Brucella canis* en humanos, de los cuales, 8 eran en personal de laboratorio o técnicos animales, 5 en personas asociadas con mascotas y 2 en personas donde la fuente de infección nunca se supo. Las historias de todos los pacientes variaban considerablemente, pero la enfermedad fue relativamente leve en comparación con brucelosis humana causada por las especies clásicas de *Brucella*.

### **3. 13. 2 SINTOMATOLOGIA**

Con un período de incubación de 2 semanas a varios meses, los síntomas son leves y escasos en comparación a otras brucelas, incluyendo linfadenopatías a nivel cervical e inguinal, esplenomegalia, afecciones en bazo, hígado, nódulos linfáticos y con mayor frecuencia en médula ósea, huesos y articulaciones, sin embargo, la fiebre ondulante no es característica de la enfermedad. (21, 22, 26, 33)

Las complicaciones más comunes son las osteoarticulares, tales como espondilitis, discoespondilitis, osteomielitis y abscesos paravertebrales, proporcionando el síntoma inicial más común: dolor de espalda. Otras complicaciones menos frecuentes son meningitis, mielitis y rigidez de nuca. (21, 26)

En órganos del sistema reproductivo lo más común es una epidídimo-orquitis unilateral con evidencia de dolor y tumefacción, además de prostatitis. El tejido placentario humano contiene una cantidad mínima o nula de eritritol, por lo que la incidencia de aborto en humanos es mínima, aunque puede ocurrir debido a la toxicidad sistémica de la bacteria. (21)

La muerte es poco común pero la mayor causa es la insuficiencia cardiaca. (21)

### **3. 13. 3 PREVENCIÓN**

Radica principalmente en el control de la enfermedad en el canino, recomendándose la eutanasia en animales infectados para reducir la incidencia de la enfermedad y el riesgo de contagio, principalmente en personas inmunocomprometidas (HIV positivas, pacientes con cáncer ó con transplante de órganos). (21)

### **3. 13. 4 DIAGNÓSTICO**

En el humano, al igual que en los caninos, el diagnóstico de laboratorio es la única forma de confirmar la enfermedad, y por la inespecificidad de los síntomas clínicos, adquiere más importancia la historia epidemiológica. Puede realizarse aislamiento a partir de sangre o médula ósea en un 20% a 30% de los casos por lo que la demostración de anticuerpos se convierte en la forma predilecta de diagnóstico. (21)

### **3. 13. 5 TRATAMIENTO**

Al igual que en caninos, para su éxito se requiere de la combinación de fármacos para reducir las recurrencias luego del tratamiento con un solo fármaco, reportadas hasta en un 40% de los casos, recomendándose en la actualidad combinaciones de doxiciclina y estreptomicina, doxiciclina y rifampicina en casos de niños y mujeres embarazadas, y doxiciclina, rifampicina y trimetropin sulfametoxazol en caso de pacientes con neurobrucelosis ó endocarditis por su penetración adecuada a nivel de la barrera hematoencefálica. (21, 25)

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 RECURSOS

#### 4.1.1 Recursos humanos:

- Personal de laboratorio.
- Investigador interesado.
- Asesores de la presente investigación.

#### 4.1.2 Recursos de laboratorio:

- Gradillas de plástico.
- Refrigeradora.
- Tubos de ensayo.
- Placa de vidrio Huddleson de 4 mm de grosor dividida en 60 cuadros de 3 x 3 cms.
- Cámara de Huddleson.
- Micropipeta unicanal de 25  $\mu$ l y 50  $\mu$ l.
- Tips desechables para micropipeta.
- Palillos de madera.

#### 4.1.3 Recursos de campo:

- 5 criaderos caninos ubicados en el departamento de Guatemala.
- 200 jeringas de 5 cc.
- 200 tubos de ensayo sin anticoagulante de 10 cc.
- 200 tubos de ensayo estériles de 5 cc. para trasvasar los sueros.
- 1 gradilla de plástico.
- 1 litro de alcohol.
- 1 libra de algodón.
- Vehículo.
- Hielera.
- Fichas técnicas para registro.



#### 4.1.4 Recursos de tipo biológico:

- 84 caninos procedentes de 5 criaderos caninos ubicados dentro del departamento de Guatemala
- Antígeno de *Brucella canis* obtenido a partir de la cepa de *Brucella canis* M<sup>-</sup> cultivada, cosechada e inactivada con un pH 7.4 y un volumen celular de 6 a 8%, conservada con merthiolate al 1% y con vida útil de 2 años, para la prueba de aglutinación rápida en placa 2-Mercaptoetanol (PARP-ME).

## 4.2 LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA

El trabajo de campo de la presente investigación se realizó en el departamento de Guatemala, Guatemala.

Cuenta con una extensión territorial de 2,253 km<sup>2</sup> repartidos en 17 municipios, con una temperatura promedio anual de 18.2°C, promedio máxima de 24.8°C y promedio mínima de 13.9°, además de 1,265.1 ml. de precipitación pluvial, 119 días de lluvia y humedad relativa promedio de 79%. Se encuentra limitado por:

Al norte: Baja Verapaz

Al sur: Escuintla

Al este: El Progreso, Jalapa y Santa Rosa

Al oeste: Sacatepéquez y Chimaltenango

Para la selección de los 5 criaderos caninos que entraron al estudio, se dividió en 5 áreas geográficas el departamento de Guatemala (Ver Anexos), siendo:

1. Área central
2. Área norte
3. Área sur
4. Área este
5. Área oeste

## 4.3 MÉTODOS

### 4.3.1 Selección de criaderos:

Para que un criadero canino fuera considerado parte del estudio, debió de cumplir a cabalidad los siguientes requisitos:

- a. Que se encontrara ubicado en cualquiera de las cinco regiones geográficas del departamento de Guatemala designadas para este estudio.
- b. Que se encontrara registrado y que fuera miembro activo de la Asociación Canófila Guatemalteca –ACANGUA–
- c. Que tuviera como mínimo 5 caninos reproductores en edad reproductiva (mayor a 2 años).
- d. Que un mínimo del 10% de caninos reproductores fueran importados.
- e. Que asistiera a exposiciones caninas tanto nacionales como internacionales.
- f. Que tuvieran historial clínico vigente y registros sobre las camadas.
- g. Que el dueño del criadero diera su respaldo completo a la realización del presente estudio.

### 4.3.2 Recolección, procesamiento y almacenamiento de las muestras de caninos:

La recolección de las muestras fue llevada a cabo por el investigador interesado en cada uno de los cinco criaderos ubicados dentro del departamento de Guatemala. Con cada criadero visitado se llenaron las boletas de campo con información específica de cada uno de los caninos muestreados (Ver Anexos).

Para la recolección de las muestras se contó con la ayuda de otra persona que ejerció presión (hemostasia) con una mano sobre el antebrazo del perro haciendo resaltar la vena Radial, y con ayuda de jeringas de 5 cc. se extrajeron 3 cc. de sangre, la que se pasó a tubos de ensayo de 10 cc. (estériles) sin anticoagulante, y que fueron puestos en una gradilla de plástico dentro de la hielera en un ángulo inclinado; después de 24 horas se procedió a la separación del suero el cual fue colocado en tubos de ensayo estériles de 5 cc. y fueron refrigerados de inmediato a 2°C. Cada muestra fue debidamente identificada según su número correlativo en la boleta de campo llenada previamente en el criadero.

Las muestras fueron recolectadas durante los meses de Marzo y Junio del 2006, en las fechas que de mutuo acuerdo se llegó con el dueño y/o encargado del criadero, según su disponibilidad, realizando la prueba PARP-ME al momento de tener la totalidad de las mismas.

#### 4.3.3 Procedimiento de PARP-ME

Este procedimiento fue realizado por el investigador interesado con ayuda de la asesora principal y los técnicos del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual consistió en:

- a. Un día antes de correr la prueba PARP-ME a todos los sueros, se preparó la solución 0.2 Molar de 2-Mercaptoetanol, mezclando para ello un volumen de 0.069 ml. de 2-Mercaptoetanol en 5 ml. de agua destilada. Dicha solución fue colocada en un frasco color caramelo y refrigerada a 4°C.
- b. El día que se realizó la prueba, se retiró el antígeno y los sueros a testear de la refrigeradora, de modo que tomaran la temperatura ambiente (18-20°C), agitándolos antes de usar.
- c. Se depositó en la placa de vidrio dentro de los cuadros marcados de 3 x 3 cms., 25 µl de cada uno de los sueros a testear, además de los controles positivo y negativo.
- d. Se depositó sobre cada uno de los sueros, 25 µl de una solución de 2-Mercaptoetanol 0.2 Molar; se homogenizó cada una de las muestras con un palillo de madera y se esperó 1 minuto.
- e. Se agregó 50 µl del antígeno perfectamente homogeneizado.
- f. Se homogenizó de nuevo cada una de las muestras con un nuevo palillo de madera; se balanceó la placa de vidrio con movimientos rotatorios y se realizó la lectura luego de 2 a 3 minutos acompañado de una fuente de luz inferior.
- g. Para la interpretación de resultados, el control negativo se presentó como una suspensión homogénea y el control positivo presentó un fino granulado y las muestras en estudio resultaron positivas o negativas según correspondió en comparación a los controles.

## 4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 4.4.1 Cálculo de porcentaje:

El cálculo por porcentaje de caninos seropositivos se realizó a través de un cálculo de regla de tres, tomando como base la muestra (n) como 100% y los caninos seropositivos como x:

$$P = \frac{x * 100}{n}$$

Dicho cálculo se realizó para las siguientes variables:

- a. *General*: para todos los caninos.
- b. *Por criadero*: por cada criadero.
- c. *Por origen*: caninos nacionales ó importados.
- d. *Por raza*: para cada una de las razas.
- e. *Por sexo*: según el total de machos y hembras.
- f. *Por edad*: se realizó una distribución en base al siguiente rango de edades:
  - 2 años – 4 años
  - 4 años 1 día – 6 años
  - Mayor a 6 años 1 día

A partir del cálculo de porcentaje, se determinaron asociaciones estadísticas entre los caninos seropositivos y las variables epidemiológicas relevantes usando la prueba de  $\chi^2$ .

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras estudiadas fueron recolectadas en 5 criaderos caninos del departamento de Guatemala. En el criadero “A” ubicado en la Ciudad Capital se recolectaron 12 muestras, en el criadero “B” ubicado en San José Pinula se recolectaron 25 muestras, en el criadero “C” ubicado en Fraijanes se recolectaron 6 muestras, en el criadero “D” ubicado en Amatitlán se recolectaron 33 muestras y en el criadero “E” ubicado en Mixco se recolectaron 8 muestras. (Ver Cuadro 3 y Gráfica 7)

En dichos criaderos, se recolectaron un total de 84 muestras sanguíneas de caninos comprendidos entre las edades de 2 y 10 años (Ver Cuadro 7 y Gráfica 11), de los cuales el 67% (56) fueron hembras y el 33% (28) machos (Ver Cuadro 6 y Gráfica 10), pertenecientes a 23 razas caninas (Ver Cuadro 5 y Gráfica 9) con un total de 65% (55) de caninos nacidos en Guatemala y un 35% (29) de caninos nacidos fuera de nuestro país. (Ver Cuadro 4 y Gráfica 8)

El rango de edad que presentó mayor número de caninos muestreados fue el de 2 a 4 años, con 38 caninos (45%); siguiéndole el rango de 4 años 1 día a 6 años, con 30 caninos (36%) y el rango de edad que presentó menor número fue el de mayores a 6 años 1 día, con 16 caninos (19%). (Ver Cuadro 7 y Gráfica 11)

Del total de caninos muestreados las razas más frecuentes fueron la Rottweiler con 18% (15), Pastor Alemán con 11% (9) y West Highland White Terrier con 8% (7). (Ver Cuadro 5 y Gráfica 9)

De los 84 caninos muestreados ninguno presentó reacción positiva a la detección de anticuerpos contra *Brucella canis* por medio de la Prueba de Aglutinación Rápida en Placa 2-Mercaptoetanol (PARP-ME), por lo que se concluye que los reproductores ubicados en los criaderos muestreados se encuentran libres de *Brucella canis*. (Ver Cuadro 1, Gráfica 1 y Cuadro 2, Gráficas 2, 3, 4, 5 y 6)

Se evaluaron 5 sueros provenientes de caninos con sintomatología clínica compatible con *Brucella canis*, sin embargo, resultaron negativos a la prueba.

No se logró determinar la asociación entre los caninos seropositivos y las variables epidemiológicas usadas en el presente estudio debido a que ninguno de los caninos resultó positivo a la prueba.

## VI. CONCLUSIONES

- No existen anticuerpos contra *Brucella canis* en los 5 criaderos caninos muestreados del departamento de Guatemala
- En el 60% de los criaderos caninos muestreados existen caninos con sintomatología clínica compatible con *Brucella canis*.
- Debido a que el 100% de los caninos muestreados resultaron negativos a la prueba PARP-ME, no se logró determinar la relación de Brucelosis canina en base a las variables de sexo, edad, raza y nacionalidad de los caninos muestreados.
- Ninguno de los criaderos caninos que entraron al presente estudio, posee algún programa de control o prevención de Brucelosis canina.



## VII. RECOMENDACIONES

- Que el presente estudio realizado por primera vez en criaderos caninos de Guatemala, sea la base para futuras investigaciones dentro del área de criaderos caninos, tanto de la ciudad capital como del interior de nuestro país.
- Por el impacto económico y potencial zoonótico es indispensable que los criaderos caninos mantengan un adecuado monitoreo de *Brucella canis* dentro de los mismos.
- Se debe de realizar un adecuado programa de prevención de Brucelosis canina a nivel nacional para evitar la introducción de la misma a nuestro país.
- Debido a que en el 60% de los criaderos caninos muestreados existen caninos con sintomatología clínica compatible de brucelosis canina y el 100% de los mismos resultaron ser negativos a la prueba PARP-ME, es necesario realizar estudios sobre las enfermedades que comparten sintomatología clínica con *Brucella canis*.

## VIII. RESUMEN

Para el presente estudio se recolectaron 84 muestras sanguíneas procedentes de 5 criaderos caninos ubicados en el departamento de Guatemala, los cuales fueron seleccionados al azar debiendo de cumplir a cabalidad siete requisitos previamente establecidos, de los cuales los mas sobresalientes eran que tuvieran una población canina del 10% con reproductores importados y que los caninos a muestrear no fueran menores a 2 años.

La totalidad de las muestras pertenecen a 23 razas caninas con un rango de edad de 2 a 10 años, con un porcentaje mayor de hembras muestreadas que machos, siendo del 67% y 33% respectivamente, de los cuales el 35% de caninos eran importados.

En el 100% de los 84 caninos muestreados, se obtuvieron resultados negativos a la detección de anticuerpos por medio de la prueba de PARP-ME a pesar de que el 6% de los mismos presentaron sintomatología clínica compatible con *Brucella canis*, por lo cual se concluye que los reproductores caninos ubicados en los criaderos muestreados se encuentran libres de anticuerpos contra *Brucella canis*, debido a ello no se realizaron las asociaciones estadísticas entre las variables de raza, edad, sexo y origen.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Acha, PN.; Szyfres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Washington, US, Organización Panamericana de la Salud. p. 14-34. (Publicación científica No. 503).
2. Akan, M.; Sareyyúoglu, B.; Tel, O. 2004. Seroprevalence of *Brucella canis* infection of dogs in Turkey (en línea). Consultado 10 mar. 2006. Disponible en <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004&PID=8944&O=Generic>
3. Azanón Robles, MA. 1980. Determinación de anticuerpos de *Brucella canis* y *Brucella abortus* en perros de la colonia La Florida, Ciudad Capital. Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 28 p.
4. Baldi, PC.; Wanke, MM.; Loza, ME.; Fossati, CA. 1993. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 41:127-134.
5. Bonagura, JD. 1995. Kirk's Current Veterinary Therapy XII. W. B. Saunders Co. 1094-1098.
6. Borie, C.; Cepeda, R.; Villarroel, M.; De los Reyes, M. 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Arch. med. vet.* 34(1):1-9.
7. Carmichael, LE. 1968. Canine brucellosis: Isolation, diagnosis, transmission. *Proc. U.S. Livestock Sanitary Associated* 71:517-527.
8. \_\_\_\_\_. 1976. Canine Brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. Reprinted from *The Cornell Veterinarian* 6(2-3):105-116.

9. \_\_\_\_\_; Bruner, DW. 1967. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* (*B. canis*) responsible for infectious canine abortions. Reprinted from The Cornell Veterinarian 58(4):579-592.
10. \_\_\_\_\_; George, L. 1984. Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. Reprinted from the American Journal of Veterinary Research 45(2):274-281.
11. \_\_\_\_\_; Joubert, JC. 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. Cornell Vet. 77:3-12.
12. \_\_\_\_\_; Kenney, RM. 1968. Canine abortion caused by *Brucella canis*. Reprint from the Journal of the American Veterinary Medical Association 152(6):605-616.
13. \_\_\_\_\_. 1970. Canine Brucellosis: The clinical disease, pathogenesis, and Immune response. Reprinted from the Journal of the American Veterinary Medical Association 156(12):1726-1734.
14. \_\_\_\_\_; Pickerill, P. 1972. Canine Brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. Reprinted from the Journal of the American Veterinary Medical Association 160(12):1607-1615.
15. \_\_\_\_\_; Shin, SJ. 1996. Canine Brucellosis: A diagnostician's dilemma. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 11(3)161-165.
16. \_\_\_\_\_. 1999. Recent advances in canine infectious diseases: Canine Brucellosis caused by *Brucella canis* (en línea). IVIS. Consultado 6 mar. 2006. Disponible en [www.ivis.org/advances/Infect\\_Dis\\_Carmichael/shin/ivis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/shin/ivis.pdf)

17. \_\_\_\_\_; Zoha, S.J. 1981. Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidiness. Reprinted from The Cornell Veterinarian 71(4):428-438.
18. \_\_\_\_\_. 1982. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (B. canis). Veterinary Microbiology 7:35-50.
19. \_\_\_\_\_; Flores-Castro, R. 1983. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: Dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Develop. Biol. Standard 56:371-383.
20. \_\_\_\_\_; Douglass, J.; Badakhsh, F. 1982. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis (en línea). Journal of Clinical Microbiology. Consultado 4 mar. 2006. Disponible en <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?artid=1277776&blobtype=pdf>
21. Cotrino, V.; Castillo, V.; Moreno, C. 2003?. Encuesta serológica sobre *Brucella canis* en pacientes atendidos en la Clínica de pequeños animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (en línea). Consultado 16 feb. 2006. Disponible en <http://lmvlt-da.com/programas/ar14.html>
22. \_\_\_\_\_; Espíndola, E. 2003?. Brucelosis canina: Revisión y reporte de casos (en línea). Consultado 4 mar. 2006. Disponible en <http://lmvlt-da.com/programas/ar18.html>
23. DelVecchio, V.G.; Kapatral, V.; Redkar, R.J.; Patra, G. 2001. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis* (en línea). Proceedings of the Academy of Sciences of the United States of America. Consultado 2 mar. 2006. Disponible en [www.cbs.dtu.dk/staff/dave/genomics\\_course/Brucella\\_melintensis.pdf](http://www.cbs.dtu.dk/staff/dave/genomics_course/Brucella_melintensis.pdf)

24. Estrada García, JF. 1976. Investigación de anticuerpos contra *Brucella canis* en la especie canina en la ciudad capital. Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 28 p.
25. Ettinger, SJ.; Feldman, EC. 2000. Tratado de medicina interna veterinaria: enfermedades del perro y el gato. Trad. RA Taibo. 5 ed. Philadelphia, US. W.B. Saunders Company. v. 1, p. 432-436, v. 2, p. 1687, 1699.
26. Euzéby, J. 1998. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire (en línea). FR. Consultado 1 mar. 2006. Disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/canis.html>
27. Flores-Castro, R.; Carmichael, LE. 1978. Canine Brucellosis: Current status of methods for diagnosis and treatment. J. Clin. Microbiology 1978:17-24.
28. \_\_\_\_\_; Segura, R. 1975. A serological and bacteriological survey of Canine Brucellosis in México. Reprinted from The Cornell Veterinarian 66(3)347-352.
29. \_\_\_\_\_; Suarez, F.; Ramirez-Pfeiffer, C.; Carmichael, LE. 1977. Canine brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in México City. Journal of Clinical Microbiology 6(6):591-597.
30. González, HB.; Ramírez, RM.; Flores, R.; Suárez, F. 2004. Reproductive problems in male dogs infected with *Brucella canis* (en línea). Consultado 21 feb. 2006. Disponible en [www.ejournal.unam.mx/vet\\_mex/vol35-02/RVM35204.pdf](http://www.ejournal.unam.mx/vet_mex/vol35-02/RVM35204.pdf)
31. Guevara, FR.; Fuentes, J.; Landínez, G. 2000. Brucelosis en niños: una causa de síndrome febril prolongado de difícil diagnóstico, revisión a partir de un caso (en línea). Consultado 4 mar. 2006. Disponible en <http://www.encolombia.com/medicina/pediatria/pediatria35400brucelosis.htm>

32. Gutiérrez Barberena, ME. 2001. Prevalencia de *Brucella canis* en perros y personas en contacto con ellos en la ciudad de Guatemala. Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 62 p.
33. GVMA (Georgia veterinary medical association, US). 2005. Canine brucellosis (*Brucella canis*) (en línea). Consultado 24 feb. 2006. Disponible en [http://www.gvma.net/associations/2613/files/K9%20Brucellosis%20Fact%20Sheet%203\\_14\\_05.pdf](http://www.gvma.net/associations/2613/files/K9%20Brucellosis%20Fact%20Sheet%203_14_05.pdf)
34. Henderson, RA.; Hoerlein, BF.; Kramer, TT.; Meyer, ME. 1974. Discospondylitis in three dogs infected with *Brucella canis*. Reprinted from the Journal of the American Veterinary Medical Association 165(5):451-455.
35. ICSP (International committee on systematics of Prokaryotes, DE). 2005. Subcommittee on the taxonomy of Brucella: Names of taxa (en línea). Consultado 24 feb. 2006. Disponible en <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm#taxa>
36. Jones, LM.; Zanardi, M.; Leona, D. 1967. Taxonomic position in the Genus Brucella of the causative agent of canine abortion. Journal of Bacteriology 95(2):625-630.
37. Jubb, KV.; Kennedy, PC.; Palmer, N. 1991. Patología de los animales domésticos. 3 ed. Uruguay, Hemisferio Sur. v. 1, p. 147, 437, v. 3, p. 390, 392-394, 498.
38. Keid, LB.; Vieira, NR.; Cortez, AD.; Richtzenhain, LJ.; Vasconcellos, SA. 2004. The polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Brucella* spp. in whole-blood of naturally infected dogs (en línea). Consultado 2 marz. 2006. Disponible en [www.biologico.sp.gov.br/arquivos/V71\\_supl\\_raib/247.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/V71_supl_raib/247.pdf)

39. \_\_\_\_\_; Soares, RM.; Morais, ZM.; Richtzenhain LJ. 2004. *Brucella* spp. isolation from dogs from commercial breeding kennels in Sao Paulo State, Brazil (en línea). Brazilian Journal of Microbiology. Consultado 21 feb. 2006. Disponible en <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v35n1-2/arg27.pdf>
40. Mateu-de-Antonio, EM.; Martin, M. 1993. 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. Am J Vet Res 54(7):1043-1046.
41. \_\_\_\_\_; Martin, M.; Casal, J. 1994. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. Reprinted from Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6(2):257-259.
42. McWilliams Engelhardt, CE. 1974. Incidencia de *Brucella canis* en perros en el distrito de Chiclayo. Tesis Med. Vet. Chiclayo, Perú, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 46 p.
43. Monroe, PW.; Silberg, SL.; Morgan, PM.; Adess, M. 1975. Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups (en línea). Journal of Clinical Microbiology. Consultado 24 feb. 2006. Disponible en <http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&blobtype=pdf&artid=274195>
44. Montes, I. 2001. Diagnóstico de la Brucelosis (en línea). Consultado 21 feb. 2006. Disponible en [www.seimc.org/control/revi\\_Sero/pdf/diagbruce.pdf](http://www.seimc.org/control/revi_Sero/pdf/diagbruce.pdf)
45. Moore, JA.; Kakuk, TJ. 1969. Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. Reprinted from the Journal of the American Veterinary Medical Association 155(8):1352-1358.



46. Myers, D.; Varela V.; Coltorti, E. 1974. Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination tests for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs (en línea). American Society for Microbiology. Consultado 4 mar. 2006. Disponible en [www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?artid=186568&blobtype=pdf](http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?artid=186568&blobtype=pdf)
47. Palacios Rosales, AE. 1989. Detección de caninos seropositivos a *Brucella canis* utilizando la prueba de aglutinación rápida en placa, aislamiento y confirmación de la bacteria (estudio de 150 casos). Tesis Med. Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 70 p.
48. Paulin, LM. 2001. Brucelose (en línea). Consultado 4 abr. 2006. Disponible en [www.biologico.sp.gov.br/ARQUIVOS/v70\\_2/paulin.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/ARQUIVOS/v70_2/paulin.pdf)
49. Peter, A. 2000. Care and management of the breeding bitch (en línea). Consultado 18 feb. 2006. Disponible en [www.vet.purdue.edu/depts/vcs/Peter/524femaledog.html#top](http://www.vet.purdue.edu/depts/vcs/Peter/524femaledog.html#top)
50. Pollock, RV. 1980. Canine Brucellosis: Current status. Compendium on continuing education 1980:255-268.
51. SOCHIVET (Sociedad chilena de infectología veterinaria, CL). 2004. Pauta técnica de vigilancia de enfermedades transmisibles en pequeños animales de compañía (en línea). Consultado 5 mar. 2006. Disponible en [http://www.vigivet.com/pauta\\_tecnica.htm](http://www.vigivet.com/pauta_tecnica.htm)
52. Tizard, IR. 1998. Inmunología veterinaria. 5 ed. México. McGraw-Hill. 567 p.

# **X. ANEXOS**



**BOLETA DE LABORATORIO PARA DIAGNÓSTICO  
DE *Brucella canis* POR MEDIO DE LA PRUEBA PARP-ME**

Número de criadero: \_\_\_\_\_

**Datos del criadero**

Fecha de recolección de muestras: \_\_\_\_\_

Nombre del criadero: \_\_\_\_\_

Dirección del criadero: \_\_\_\_\_

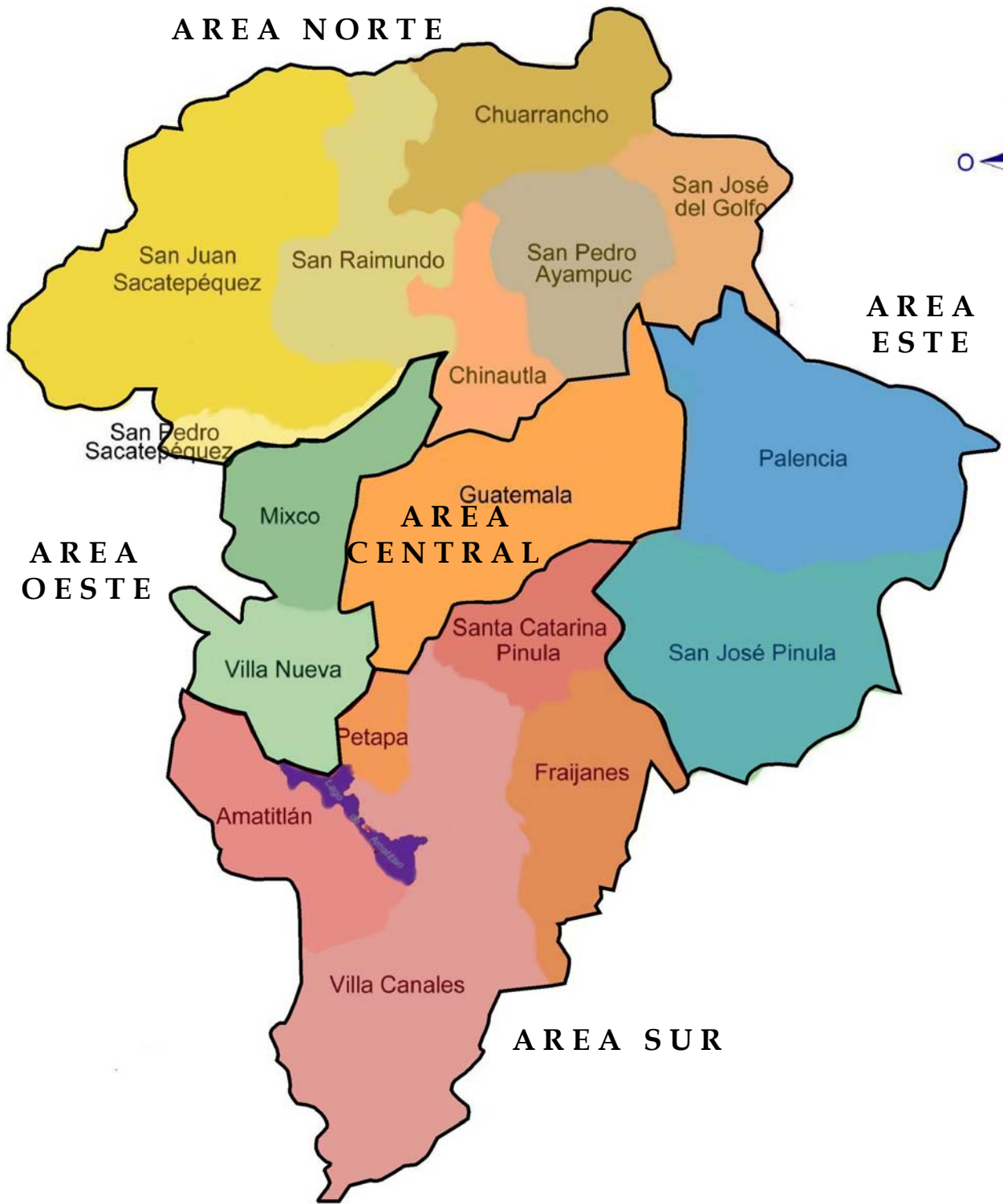
Nombre del propietario: \_\_\_\_\_

Número de teléfono: \_\_\_\_\_

Número total de muestras a procesar: \_\_\_\_\_

ID TUBO	RESULTADO PARP-ME	
	Positivo	Negativo
1, 1		
1, 2		
1, 3		
1, 4		
1, 5		
1, 6		
1, 7		
1, 8		
1, 9		
1, 10		
1, 11		
1, 12		
1, 13		
1, 14		
1, ∞		

# UBICACIÓN DE LAS 5 REGIONES GEOGRÁFICAS PARA LA SELECCIÓN DE LOS CRIADEROS CANINOS EN EL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA, GUATEMALA



## UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS 5 CRIADEROS CANINOS MUESTREADOS EN EL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA, GUATEMALA.



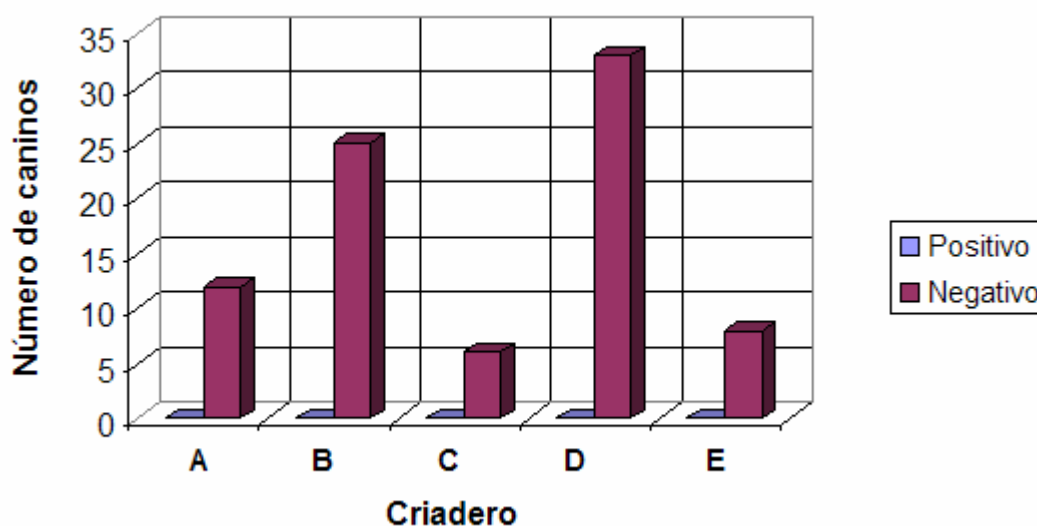
## CUADRO 1

**Distribución general de resultados de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

Criadero	Resultado PARP-ME		Total
	POSITIVO	NEGATIVO	
Criadero "A"	0	12	12
Criadero "B"	0	25	25
Criadero "C"	0	6	6
Criadero "D"	0	33	33
Criadero "E"	0	8	8
<b>Total</b>			<b>84</b>

**GRAFICA 1**

**Distribución general de resultados de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**





## CUADRO 2

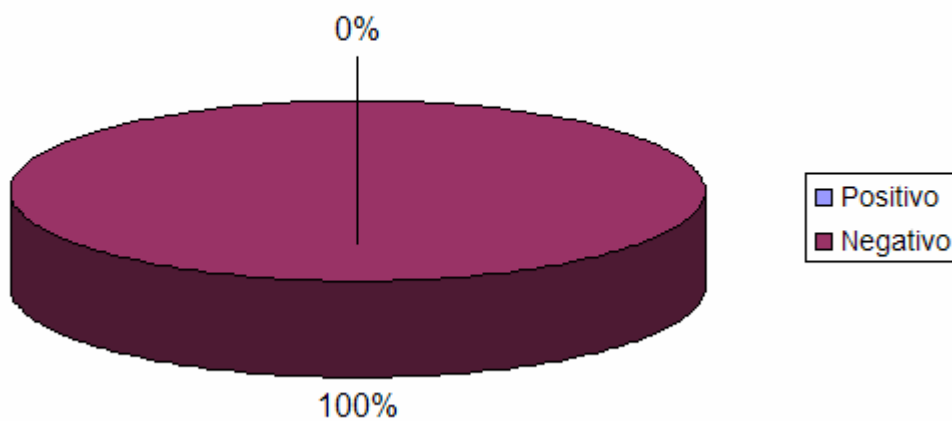
**Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

Criadero	Resultado PARP-ME		Total
	% seropositivos	% seronegativos	
Criadero "A"	0	100 %	100 %
Criadero "B"	0	100 %	100 %
Criadero "C"	0	100 %	100 %
Criadero "D"	0	100 %	100 %
Criadero "E"	0	100 %	100 %

**GRAFICA 2**

**Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

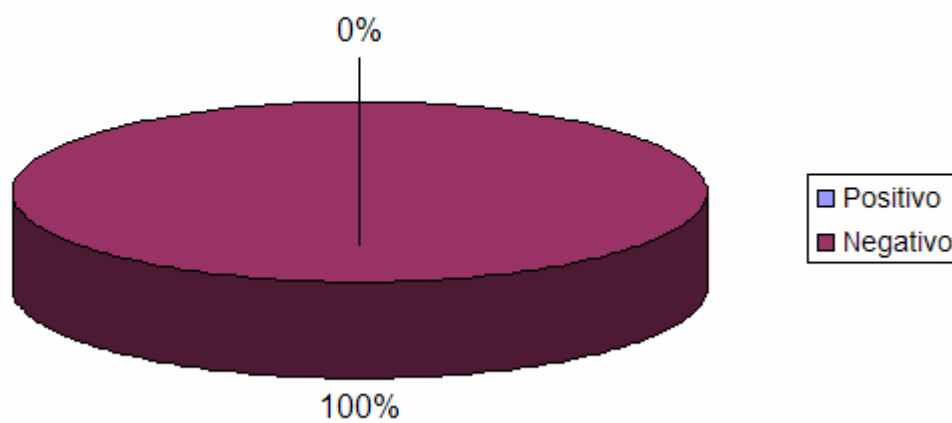
**Criadero "A"**



**GRAFICA 3**

**Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

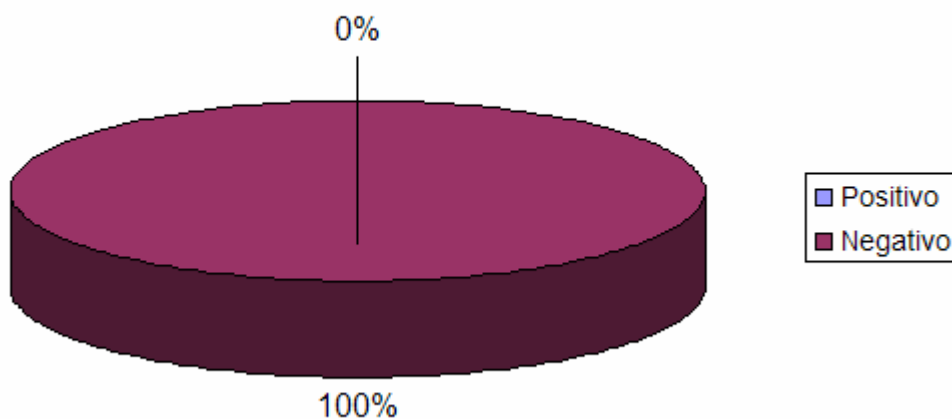
**Criadero "B"**



**GRAFICA 4**

**Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

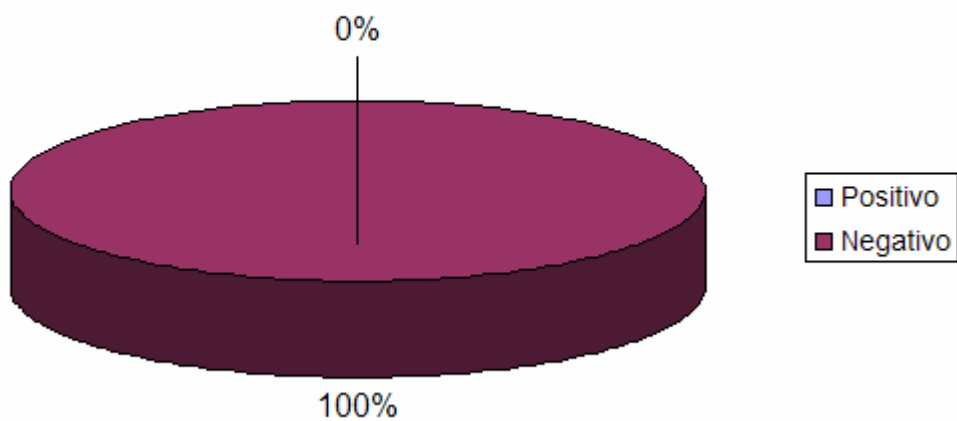
Criadero "C"



**GRAFICA 5**

**Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

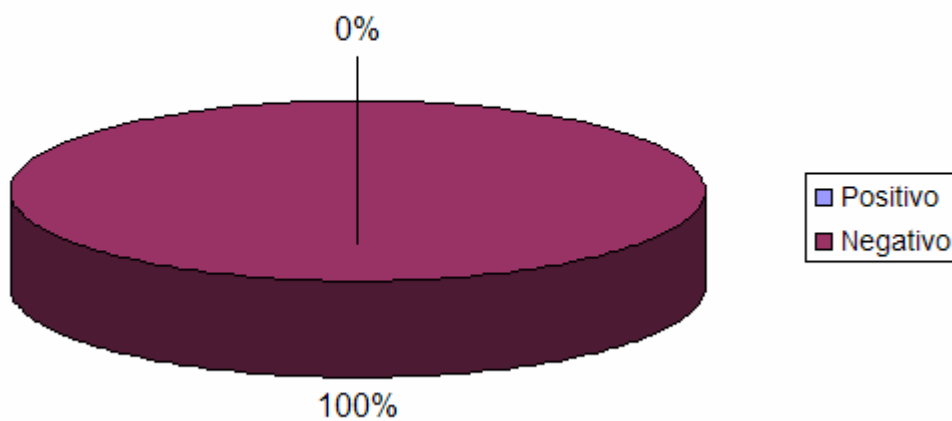
Criadero "D"



**GRAFICA 6**

**Distribución general de caninos seropositivos y seronegativos por criadero contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

Criadero "E"



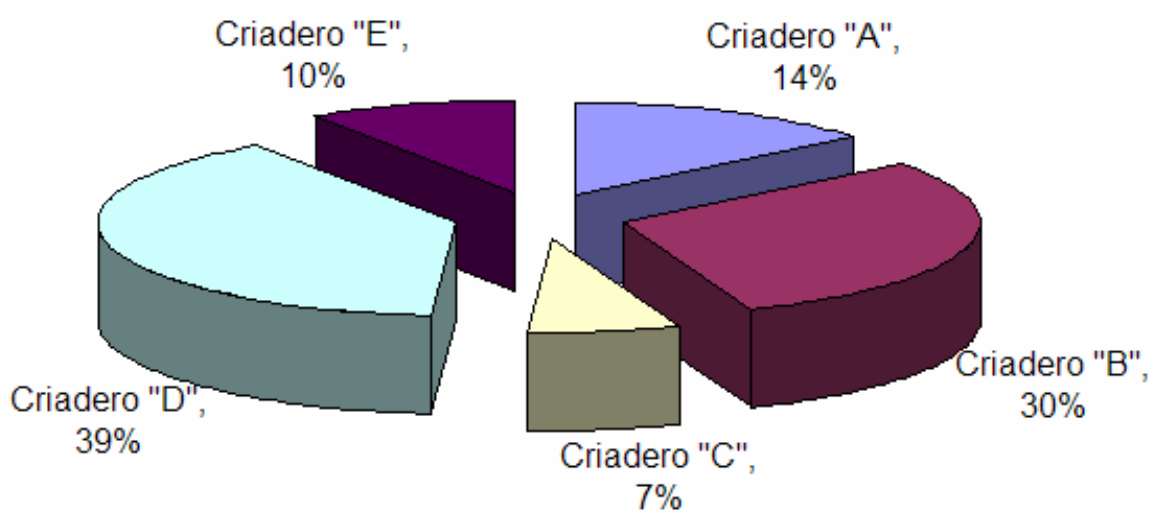
**CUADRO 3**

**Distribución por criadero de los caninos muestreados contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**

<b>Criadero</b>	<b>Número de caninos</b>	<b>Porcentaje</b>
Criadero "A"	12	14.3 %
Criadero "B"	25	29.8 %
Criadero "C"	6	7.1 %
Criadero "D"	33	39.3 %
Criadero "E"	8	9.5 %
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>100%</b>

**GRAFICA 7**

**Distribución por criadero de los caninos muestreados contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.**





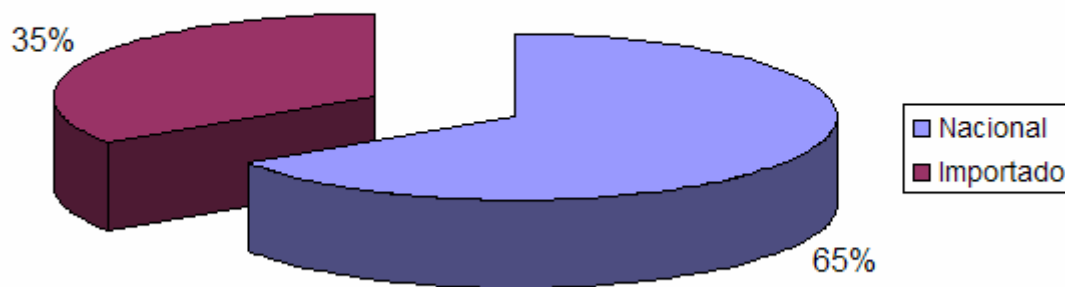
**CUADRO 4**

**Distribución por origen de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**

<b>Origen</b>	<b>Número de caninos</b>	<b>Porcentaje</b>
Nacional	55	65 %
Importado	29	35 %
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>100%</b>

**GRAFICA 8**

**Distribución por origen de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**



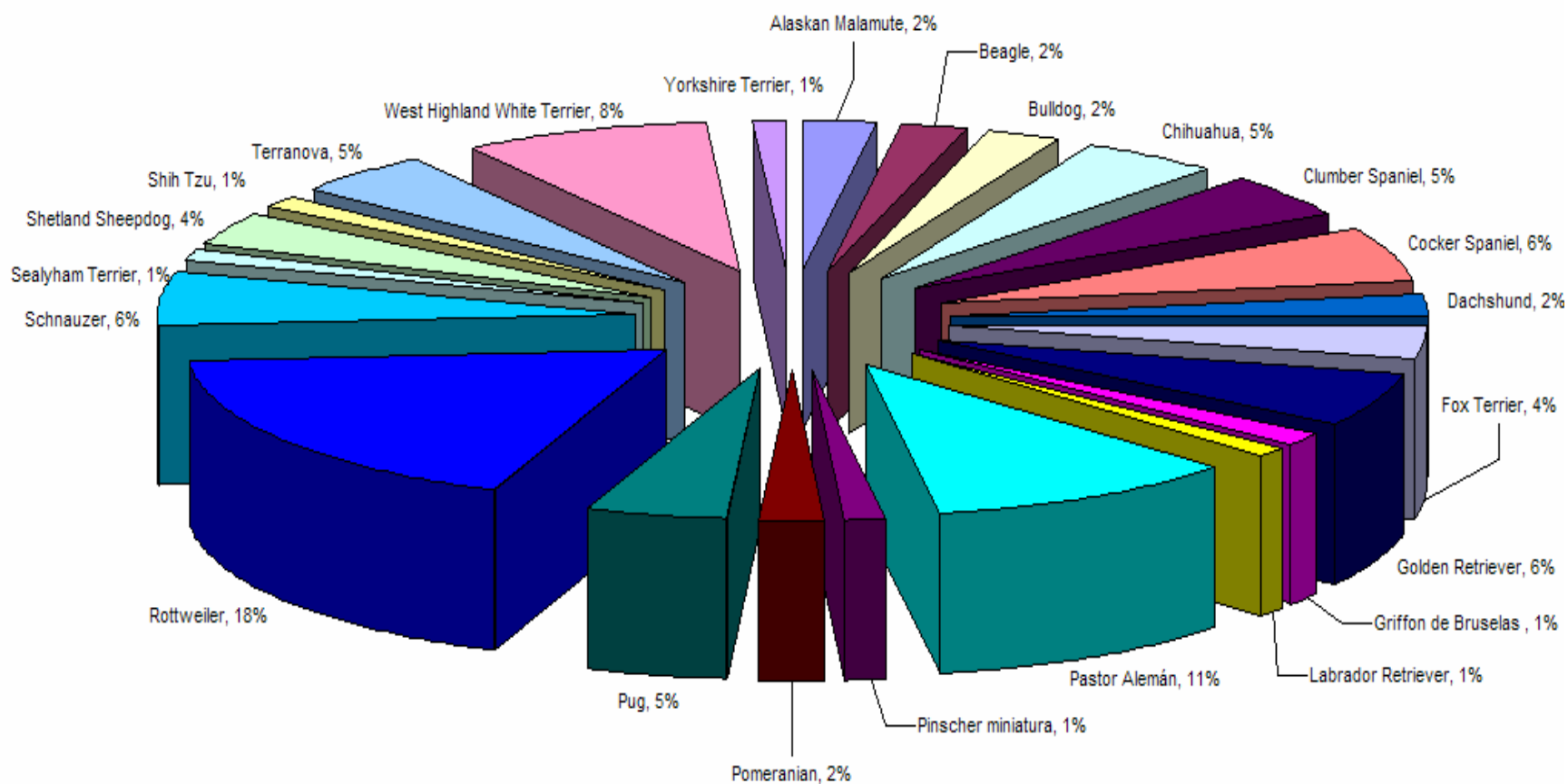
## CUADRO 5

**Distribución por raza de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**

Raza	Número de caninos	Porcentaje
Alaskan Malamute	2	2.38%
Beagle	2	2.38%
Bulldog	2	2.38%
Chihuahua	4	4.76%
Clumber Spaniel	4	4.76%
Cocker Spaniel	5	5.95%
Dachshund	2	2.38%
Fox Terrier	3	3.57%
Golden Retriever	5	5.95%
Griffon de Bruselas	1	1.19%
Labrador Retriever	1	1.19%
Pastor Alemán	9	10.74%
Pinscher miniatura	1	1.19%
Pomeranian	2	2.38%
Pug	4	4.76%
Rottweiler	15	17.86%
Schnauzer	5	5.95%
Sealyham Terrier	1	1.19%
Shetland Sheepdog	3	3.57%
Shih Tzu	1	1.19%
Terranova	4	4.76%
West Highland White Terrier	7	8.33%
Yorkshire Terrier	1	1.19%
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>100%</b>

## GRAFICA 9

Distribución por raza de los caninos muestreados contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el período de Febrero a Julio de 2006.



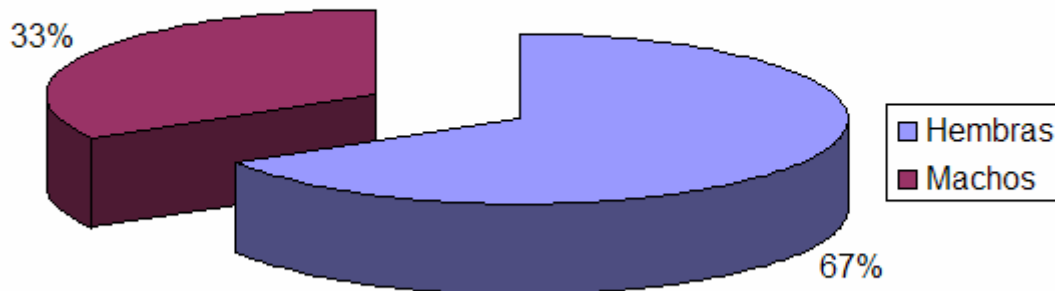
**CUADRO 6**

**Distribución por sexo de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**

<b>Sexo</b>	<b>Número de caninos</b>	<b>Porcentaje</b>
Hembras	56	67 %
Machos	28	33 %
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>100%</b>

**GRAFICA 10**

**Distribución por sexo de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**



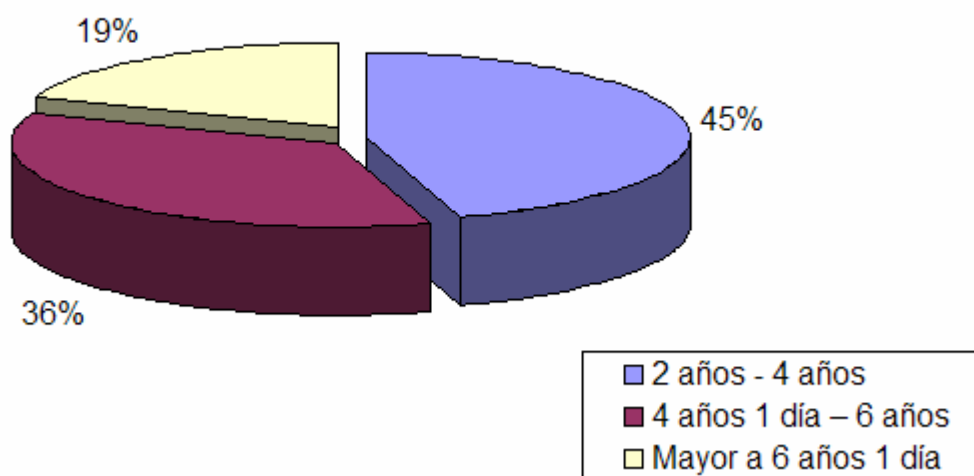
**CUADRO 7**

**Distribución por edad de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**

<b>Rangos de edad</b>	<b>Número de caninos</b>	<b>Porcentaje</b>
2 años – 4 años	38	45 %
4 años 1 día – 6 años	30	36 %
Mayor a 6 años 1 día	16	19 %
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>100%</b>

**GRAFICA 11**

**Distribución por edad de los caninos muestreados  
contra *Brucella canis* por medio de la prueba PARP-ME durante el  
período de Febrero a Julio de 2006.**





# APENDICES

## RESPUESTA INMUNE DE PERROS A BACTERINAS INACTIVADAS DE *Brucella canis*

Tipo de vacuna	Vía de administración *	Título de aglutinación ** (rango)	Reacciones en el sitio de inoculación	Número de perros inmunes / perros desafiados †
Inactivada con formalina (salina)	IM	1:50 a 1:200 (P)	Ninguna	0 / 6
	SC	1:50 a 1:100 (P)	Ninguna	0 / 6
Inactivada con formalina (gel de fosfato de aluminio)	IM	1:50 a 1:200 (P)	Ninguna	0 / 4
	SC	1:50 a 1:100 (P)	Ninguna	0 / 4
Inactivada con calor (gel de hidróxido de aluminio)	IM	1:50 (P)	Ninguna	0 / 3
Inactivada con formalina (adyuvante de aceite de manía-aluminio monoesteratoaracel)	IM	1:50 a 1:500 (P)	Ninguna a leve	2 / 6
	SC	1:50 a 1:250 (P)	Ninguna	0 / 2
Inactivada con calor (adyuvante de alginato de calcio)	IM	1:25 a 1:100 (P)	Ninguna	0 / 4
Inactivada con calor (adyuvante incompleto de Freund)	IM	1:100 a 1:250	Severa	3 / 3
	SC	150 a 1:100	Moderada a severa	2 / 3
B. abortus 45/20, agua en aceite mineral	IM	1:250 a 1:1,000	Moderada a severa	3 / 4
	SC	1:250 a 1:500	Leve a severa	4 / 4
Controles	-----	-----	-----	0 / 24

\* : Las vacunas fueron administradas vía intramuscular (IM) ó subcutánea (SC) en un volumen de 1 ml. El rango de dosis se encuentra entre  $10^{11}$  a  $8 \times 10^{11}$  organismos. Se administraron dos inoculaciones con intervalos de 3 a 4 semanas.

\*\* : Los títulos representan el rango de diluciones de suero que dieron al menos el 50% de aglutinación. En la mayoría de instancias ocurrió aglutinación parcial (P), excepto con bacterinas que poseían adyuvante de emulsión de agua en aceite, donde la aglutinación completa ocurrió a bajas diluciones. Los títulos representan los resultados de las pruebas realizadas 3 a 4 semanas después de la segunda vacunación.

† : Los perros fueron considerados inmunes si no desarrollaron bacteremia después de la administración oral de  $10^8$  a  $10^{10}$  organismos viables de 2 a 3 meses después de la vacunación final.

**Fuente:** Carmichael, L. Canine Brucellosis: The clinical disease, pathogenesis, and immune response. Journal of the American Veterinary Medical Association 156(12):1726-1734.

**RESPUESTA DE CANINOS A LA VACUNACIÓN CON  
LA VARIANTE ATENUADA SM DE *Brucella canis***

Grupo de caninos vacunados (#)	Dosis de inoculación	Respuestas clínicas	Título de anticuerpos aglutinantes **	Resultados del desafío †
Perras preñadas (2)	10 <sup>9</sup>	Engrandecimiento leve de nódulos linfáticos; bacteremia de 1 a 6 meses*; parieron cachorros normales.	1:50 a 1:100 (P). 6 meses de duración.	Inmunes (2/2) 14 meses post-vacunación.
Perras no fértiles (3)	10 <sup>8</sup>	Engrandecimiento leve de nódulos linfáticos; bacteremia mayor a 3 meses.	1:25 a 1:50 (P). Mayor a tres meses de duración.	Inmunes (5/5) 3 meses post-vacunación.
Perros fértiles (3)	10 <sup>8</sup>	Engrandecimiento leve de nódulos linfáticos; bacteremia mayor a 3 meses; ningún signo genital.	1:25 a 1:50 (P). Mayor a tres meses de duración.	Inmunes (5/5) 3 meses post-vacunación.
Controles (3)	-----	Engrandecimiento de nódulos linfáticos; epididimitis, atrofia testicular; bacteremia mayor a 6 meses.	1:500 a 1:1,000. Mayor a seis meses de duración.	No inmunes (3/3)

\* : Solamente la variante SM (Smooth-mucoid).

\*\* : Sueros evaluados con antígeno estándar de *Brucella canis*. Aglutinación parcial (P) a la dilución más alta.

† : Inmunidad de los perros desafiados con un rango de dosis de 10<sup>9</sup> a 8 x 10<sup>9</sup> organismos vía oral (0.8 ml) junto con instilación en el saco conjuntival (0.2 ml).

**Fuente:** Carmichael, L. Canine Brucellosis: The clinical disease, pathogenesis, and immune response. Journal of the American Veterinary Medical Association 156(12):1726-1734.

## PRUEBAS SEROLÓGICAS USADAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Brucella canis*

Test serológico	Antígeno	Tiempo para obtener resultados positivos	Comentarios
PARP-ME (Prueba de aglutinación rápida en placa 2-Mercapto etanol)	Pared celular	3 a 6 semanas post-infección hasta que el canino no presenta bacteremia	Rápida, fácil, muy sensible: falsos positivos son comunes, pocos falsos negativos (1%)
PAT (Prueba de aglutinación en tubo)	Pared celular	3 a 6 semanas	Determinación semi cuantitativa, resultados falsos positivos similares a PARP-ME
PAT-ME (Prueba de aglutinación en tubo 2-Mercapto etanol)	Pared celular	5 – 8 semanas	Mayor especificidad que PAT pero con mayor tiempo para obtener títulos positivos comparada con PAT
IDGA (inmunodifusión en agar gel)	Pared celular (LPS)	5 – 10 semanas	Muy sensible, positiva antes que con AgCP. Procedimientos e interpretación complejos, reacciones inespecíficas
IDGA – AgCP (inmunodifusión en agar gel con antígeno de proteína citoplasmática interna)	AgCP	8 – 12 semanas	Es la prueba mas específica (confirmadora), detecta casos crónicos cuando otras pruebas son negativas. Procedimiento complejo, menos sensible para la selección inicial.
Inmuno-fluorescencia	Pared celular (LPS)	Desconocido	Menos sensible que PAT-ME como prueba de selección
ELISA	Pared celular (LPS) ó AgCP	Desconocido	Muy específico, menos sensible que la prueba de aglutinación rápida en tubo. Buenos resultados con <i>B. canis</i> mutante (M-) para extractos de pared celular.

**Fuente:** Carmichael, L., Shin, S. Canine Brucellosis: A diagnosticianis dilemma. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 1996.

---

**Br. JUAN PABLO DEL AGUILA PADILLA**

---

**Dra. JACQUELINE ESCOBAR**  
**Asesora principal**

---

**Dr. CARLOS CAMEY**  
**Asesor**

---

**Dr. EDGAR LOAIZA**  
**Asesor**

**Imprímase**

---

**Lic. Zoot. MARCO VINICIO DE LA ROSA MONTEPEQUE**  
**Decano**