



Universidad Nacional
de
General San Martín
Maestría en Microbiología Molecular
Tesis:

**"BRUCELOSIS CANINA: COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD Y
ESPECIFICIDAD Y RAZÓN DE VEROSIMILITUD POSITIVA DE 4
ENSAYOS DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE *Brucella* spp EN MUESTRAS
CLÍNICAS DE CANINOS"**

Autor: Eduardo Jorge Boeri. Instituto de Zoonosis Luis Pasteur Ciudad Autónoma de Buenos Aires. División inmunología y diagnóstico. Sección serología y pruebas biológicas área zoonosis bacterianas.

Director: Dr. Marcos David Trangoni. Laboratorio de Brucella, Campylobacter y Microbiota. Instituto de Biotecnología CICVyA-CNIA INTA.

Buenos Aires, noviembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi tutor Dr. Marcos Trangoni por aceptar ser mi guía y aportar su experiencia en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio Biológico del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur de la Ciudad de Buenos Aires: Dr. Fernando Beltrán, Dr. Gabriel Cicuttin, Dra. Julia Madariaga, Licenciada Nazarena De Salvo y Técnica María Teijeiro por ayudar en el procesado de algunas de las muestras del trabajo y por todos los aportes y sugerencias cuando las cosas fueron un poco complicadas.

A mi Jefe Dr. Federico Gury Dhomen por permitirme desarrollar ideas no solo en el plano intelectual si no en el práctico.

A mi Jefa Dra. Marta Tealdo por el apoyo en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Nora Castiglia por sus sugerencias metodológicas y procesadas de los datos estadísticos del trabajo.

Al Dr. Edgardo Marcos quien siempre insistió en el empuje para que los profesionales nos capacitáramos y siguiéramos adelante.

Al Dr. Silvio Cravero quien fuera el que me enseñó los primeros pasos en el mundo de la biología molecular.

Al Dr. Sebastián Elena por el procesado de una buena parte de los cultivos microbiológicos.

A la Dra. Magdalena Wanke por su aporte de experiencia y con quién tomamos parte de las muestras de este trabajo.

A la Dra. Nidia Lucero que me dio la posibilidad de ingresar en el mundo de la brucelosis y me guió en mis primeros pasos en el conocimiento de esta enfermedad.

A todo el equipo del laboratorio de referencia de brucelosis del Anlis, Instituto Malbrán: Dra. Gabriela Escobar, Técnica Sandra Ayala y Técnica Deborah Hasan por el procesado de algunas de las muestras para serología.

A María Teresa de Urquiza, compañera de maestría quien me cedió cepas de referencia para realizar una prueba de este trabajo.

A mis compañeras de vida: Carina, Micaela y Paula.

A mi madre y hermanos y a todos los que me apoyaron para que desarrollara este trabajo.

Finalmente, a la memoria de mi gran amigo Diego Azcoitía y de mi padre.

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Fundación Alberto J. Roemmers FAJR 2013 /2015.

INDICE TEMÁTICO

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Historia de la brucelosis	2
1.2 Clasificación taxonómica del género <i>Brucella</i>	3
1.3 Género <i>Brucella</i>	4
1.4 Patogenia	6
1.5 Enfermedad en humanos y animales	7
1.6 Brucelosis canina	9
1.6.1 Diagnóstico	13
1.6.2 Zoonosis	13
1.7 Reacción en cadena de la polimerasa	13
1.7.1 Regiones génicas blancos para el diagnóstico molecular	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos particulares	17
	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Diseño, población y muestras	18
3.2 Método Gold Estándar	19
3.2.1 Definición de animales sanos y enfermos	20
3.3 Pruebas moleculares para detección de <i>Brucella</i> spp	21
3.3.1 Genes / regiones génicas amplificados por PCR	23
3.3.2 Sensibilidad analítica (límite de detección)	23
3.3.2.1 Muestras de sangre	24
3.3.2.2 Muestras de flujos	24
3.3.2.3 Muestras de orina	25
3.3.3 Especificidad analítica	25
3.4 Índice de concordancia de los 4 ensayos de PCR	25
3.5 Análisis estadístico	25

4. RESULTADOS	
4.1 Muestras	27
4.2 Pruebas serológicas y bacteriológicas de los animales sanos	27
4.3 Pruebas serológicas y bacteriológicas de animales enfermos	27
4.4 Manifestaciones clínicas y epidemiología compatible de animales enfermos	28
4.5 Sensibilidad analítica / límite de detección	28
4.5.1 Sensibilidad analítica en muestras de sangre	29
4.5.2 Sensibilidad analítica en muestras de flujos genitales	30
4.5.3 Sensibilidad analítica en muestras de orina	31
4.6 Especificidad analítica	33
4.7 Índice de concordancia entre los 4 ensayos de PCR	34
4.8 Sensibilidad y especificidad diagnóstica	34
4.9 Análisis estadísticos de los resultados	37
5. DISCUSIÓN	
5.1 Cultivos bacteriológicos	38
5.2 Pruebas serológicas	38
5.3 Genes estudiados	39
5.3.1 Gen codificante para BCSP31	40
5.3.2 Secuencias de inserción IS711	41
5.3.3 Gen 16S-23S rDNA del espaciador	41
5.3.4 Genes <i>omp2a</i> y <i>omp2b</i>	42
5.4 Índice de concordancia	43
5.5 Razón de verosimilitud positiva	43
5.6 Curvas ROC	44
5.6 Consideraciones finales	45
6. CONCLUSIONES	45
7. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del género <i>Brucella</i>	4
Tabla 2. Combinación de pruebas para definir el Gold Estándar establecido	21
Tabla 3. Termociclados realizados con cada par de cebadores	22
Tabla 4. Cebadores utilizados con la región que amplifica y el tamaño del amplicón obtenido	23
Tabla 5. Límite de detección de los 4 pares de cebadores expresado en UFC/mL	32
Tabla 6. Concordancia entre los 4 ensayos de PCR y el Gold Estándar	34
Tabla 7. Sensibilidad, especificidad y RV+ de 4 ensayos de PCR en 595 muestras contrastadas con el Gold Estándar	34
Tabla 8. Sensibilidad, especificidad y RV+ de 4 cebadores en sangre sobre 244 muestras	35
Tabla 9. Sensibilidad, especificidad y RV+ de 4 cebadores en flujo sobre 250 muestras	35
Tabla 10. Sensibilidad, especificidad y RV+ de 4 cebadores en orina sobre 101 muestras	35
Tabla 11. Resultados del test de ANOVA mostrando valores del área bajo la curva y su valor p	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la envoltura bacteriana de las brucelas lisas y rugosas	5
Figura 2. Epididimitis	10
Figura 3. Dermatitis y edema escrotal	10
Figura 4. Aborto tardío	11
Figura 5. Descarga genital patológica en una hembra	11
Figura 6. Discoespondilitis severa	12
Figura 7. Gráfico de la distribución de los signos clínicos hallados en 55 de los 298 perros positivos al Gold Estándar	28
Figura 8. Determinación de la sensibilidad analítica en muestras de sangre	29
Figura 9. Determinación de la sensibilidad analítica en muestras de flujos genitales	30
Figura 10. Determinación de la sensibilidad analítica en muestras de orina	31
Figura 11. Especificidad analítica de los 4 grupos de cebadores estudiados	33
Figura 12. Curvas ROC de las 4 PCR con el ABC y su respectivo IC de las 595 muestras evaluadas	36

ABREVIATURAS

ABC: área bajo la curva

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGID: inmunodifusión en agar gel

ANOVA: análisis de la varianza

BPA: antígeno tamponado en placa

CABA: Ciudad autónoma de Buenos Aires

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

Esp: especificidad

GE: Gold estándar

IZLP: Instituto de zoonosis Luis Pasteur

LPS: lipopolisacárido

ME: membrana externa

mL: mililitros

μL: microlitros

MpM: marcador de peso molecular

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR1: cebadores B4/B5

PCR2: cebadores ITS66/ITS279

PCR3: cebadores JPF / JPR CA

PCR4: cebadores O1/O2

qPCR: PCR en tiempo real

ROC: Característica Operativa del Receptor

RSAT: aglutinación rápida en placa

RSAT-2ME: aglutinación rápida en placa con agregado de 2-mercaptoetanol

RV+: razón de verosimilitud positiva

S: sensibilidad

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Animal

TAE: Tris-acetato-EDTA

TE: buffer Tris EDTA

TSB: buffer tris base salino

UFC: unidad formadora de colonias

RESUMEN

RESUMEN

La brucelosis canina es una enfermedad infectocontagiosa que afecta caninos salvajes y domésticos dando síntomas de infertilidad en machos y hembras y, ocasionalmente, se transmite al hombre. El diagnóstico es dificultoso a pesar de las nuevas técnicas disponibles entre ellas serológicas, bacteriológicas y moleculares. Por esta razón, se deben realizar varias pruebas para llegar a un resultado confiable para la toma de decisiones. Al momento no se encuentra publicado ningún trabajo que evalúe el empleo de distintas regiones génicas para el diagnóstico de esta enfermedad. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue comparar la sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud positiva de 4 ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de *Brucella* spp en muestras clínicas de caninos. Fueron evaluadas 244 muestras de sangre, 101 de orina y 250 de flujos, dando un total de 595 entre animales sanos y enfermos. La muestra fue equilibrada para poder obtener los valores de cribaje de los 4 ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) contrastados con el Gold estándar establecido. El mismo fue predefinido por medio de diferentes combinaciones de pruebas serológicas, bacteriológicas y nexos epidemiológico. Se utilizó como prueba tamiz la técnica de RSAT (aglutinación rápida en placa) y como prueba confirmatoria la AGID (inmunodifusión en agar gel) y el iELISA (inmunoensayo enzimático indirecto). A todos los animales se les realizó hemocultivo y a los caninos machos, además, urocultivo. Los genes evaluados en los 4 ensayos de PCR fueron los siguientes: gen codificante para la proteína BCSP31, el gen ribosomal del espaciador 16S-23S rDNA, las secuencias de inserción IS711 y los genes *omp2a* y *omp2b*. De la totalidad de animales muestreados, 297 correspondieron a animales sanos y 298 positivos al Gold estándar. La sensibilidad y especificidad de los ensayos de PCR fue la siguiente: gen codificante para la proteína BCSP31 sensibilidad 45,64 % (IC 39,81 -51,46) y especificidad 95,62 % (IC 93,13 - 98,12); gen ribosomal del espaciador 16S-23S sensibilidad 69,80 % (IC 64,42 - 75,18) y especificidad 93,94 % (IC 91.06 - 96.82); genes *omp2a* y *omp2b* sensibilidad 39,26 % (IC 33,55- 44,97) y especificidad 97,31 % (IC 95,30 – 99,32); secuencias de inserción IS711 sensibilidad; 22,82% (IC 17,89 – 27,75) y especificidad 99,66 % (IC 98,84-100). Se concluyó que el gen ribosomal fue el que mejor sensibilidad diagnóstica tuvo y que los 4 genes testados tuvieron una muy buena especificidad entre el 95 y 99% (IC 91.05 -100).

INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, zoonótica y de curso agudo a crónico producida por bacterias del género *Brucella* que afecta distintas especies de mamíferos incluida el hombre. Se encuentra distribuida a lo largo del mundo con más de 500.000 personas afectadas en América Latina, Asia central y varias regiones del mediterráneo (Von Bargen y col.,2012).

El antecedente más remoto de posible brucelosis se puede ver en el libro de Epidemias de Hipócrates, donde se describe una condición de fiebre recurrente con una duración de 4 meses, y muerte en el año 450 AC (Hughes ML, 1897). En un estudio del año 2002, se describieron lesiones típicas de brucelosis en restos óseos de personas que perecieron en la erupción volcánica del Vesubio en el 49 a. C (Capasso, 2002).

Existen varios reportes de fiebre ondulantes durante los siglos XVI, XVII y XVIII, los que fueron tomando diferentes nombres como ser: Fiebre Mediterránea, Fiebre de Malta y Fiebre de Gibraltar entre otros.

Willam Burnett fue el primero en estudiar la enfermedad en la isla de Malta en soldados británicos que estaban en recuperación durante la guerra de Crimea. En 1861 Jeferry Allen Marston, sargento británico que contrajo la fiebre de Malta, escribió en detalle los síntomas clínicos de su propia afección: fiebre irregular durante 90 días, síntomas gastrointestinales y dolores musculares.

El microorganismo fue aislado por primera vez por David Bruce en Julio de 1887 del bazo de un soldado muerto por la enfermedad y lo llamó *Micrococcus melitensis*. Pudo observar que el crecimiento era mejor con altas temperaturas y estableció que las cabras eran el reservorio de la enfermedad identificándolo en sangre, orina y leche. Estos hallazgos ayudaron a explicar la epidemiología de la enfermedad.

En 1895 un veterinario de Dinamarca, B. Bang, aisló un microorganismo del útero de un bovino que había abortado y lo identificó como “*Bacillus abortus*” (actualmente *B. abortus*). En 1914 J.Traum llamó “*american mellitenis*” al aislamiento obtenido a partir de un aborto porcino, actualmente *B. suis*. En 1920 Meyer y Shaw denominaron *Brucella abortus* y *Brucella mellitensis* en honor a D. Bruce, creando de este modo el género *Brucella*. Recién para el año 1956 se describe una nueva especie cuando Buddle reporta como responsable de la epididimitis en carneros y abortos en ovejas de Australia a *B. ovis*. Poco después, en 1957, Stoenner y Lackman describen *B. neotomae*

aislada de roedores del desierto. Años más tarde, Carmichael y Kenny, aíslan *B. canis* de abortos de un criadero de caninos en 1968. Más recientemente, Foster en 2007, aisló la *B. ceti* y *B. pinnipedalis* a partir de cetáceos y focas. Al año siguiente (2008), Scholz aísla *B. microti* a partir de *Microtis arvalus* y dos años más tarde (2010), el mismo autor, aísla *B. inopinata* a partir de un implante mamario de una paciente de 71 años. En los últimos dos años, se aislaron nuevas especies que se comentan más adelante.

1.2 Clasificación taxonómica del género *Brucella*

De acuerdo con el análisis de las secuencias del ácido ribonucleico 16S (ARNr 16S), el género *Brucella* está categorizado dentro del grupo alfa del subgrupo 2 de la clase Proteobacteria la cual tiene relación filogenética con *Bartonella*, *Rickettsia*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Rhodobacteraceae* (Moreno y col., 1990).

Estudios de hibridación DNA-DNA han demostrado una homología mayor a un 95% entre los distintos tipos de *Brucella* (Tomas Fitch, 2010) lo que ha generado cierta controversia respecto a la clasificación de las diferentes especies de *Brucella*. Sin embargo, actualmente se utiliza la taxonomía clásica que diferencia a las especies por su afinidad con el hospedador y ha sido reconocida nuevamente por el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* (Osterman y Moriyón, 2006): *B. melitensis* tiene preferencia por caprinos y ovinos, *B. abortus* por bovinos, *B. suis* por cerdos, *B. canis* por caninos, *B. ovis* por ovinos, *B. neotomae* por ratas del desierto, *B. cetaceae* por cetáceos, *B. pinnipedialis* por focas y *B. microti* por un roedor de campo. Recientemente se aislaron dos especies nuevas, *B. papionis* sp. en mandriles (Whatmore y col., 2014) y *B. vulpis* sp en zorros colorados (Scholz y col., 2016). Cada especie tiene una gran afinidad por su hospedador sin embargo, pueden encontrarse en diferentes especies de animales ocasionando síntomas inespecíficos.

En la **tabla 1** se resumen las características del género *Brucella*.

Tabla 1. Características de las especies del género *Brucella*.

<i>Brucella</i>	Especie	Hospedador	Biovars	Patogenicidad en el hombre
	<i>B. melitensis</i>	Cabras, ovinos, camélidos	1,2,3	Alta
	<i>B. abortus</i>	Bovino	1,2,3,4,5,6,9	Moderada
Lisas	<i>B. suis</i>	Cerdo, roedores salvajes	1,2,3,4,5	Moderada / alta según biovar
	<i>B. ceti</i>	Ballenas y delfines	ND	baja
	<i>B. pinnipedalis</i>	Focas, lobos marinos	ND	ND
	<i>B. inopinata</i>	Humanos	ND	ND
	<i>B. neotomae</i>	Roedores	ND	ND
	<i>B. microti</i>	Roedores y zorros	ND	ND
Rugosas	<i>B. ovis</i>	Ovinos	ND	
	<i>B. canis</i>	Caninos	ND	Baja
Nuevas especies	<i>B. papionis</i>	Mandriles	ND	ND
	<i>B. vulpis</i>	Zorros colorados	ND	ND

ND: no descripto

1.3 Género *Brucella*

Brucella es una bacteria Gram negativa inmóvil de estructura cocobacilar de 0,5 a 0,7 micrones (μ) de diámetro y de 0,5 a 1,5 μ de largo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C en un pH de 6,6 a 7,4. No posee cápsula ni forma espora y carece de plásmidos. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares con un tamaño de 2,2 Mb y 1,1 Mb, conteniendo un 58 – 59 % de Guanina + Citosina (G+C) (Michaux-Charachon S y col., 1997). *Brucella* es aeróbica estricta y posee un metabolismo oxidativo utilizando nitratos como aceptores de electrones. No atacan la gelatina ni modifican la leche, son catalasa y oxidasa positivos, y en general no fermentan los azúcares (Wilfert CM, 1986).

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas, aunque durante su crecimiento en los medios de cultivo pueden experimentar mutaciones que afectan la expresión del LPS (Ariza Cardenal J, 1995).

Brucella posee la membrana celular similar en su estructura a otras bacterias Gram negativas, sin embargo, tiene características que la diferencian en los componentes de la membrana externa (ME) como ser los lípidos y polisacáridos.

El peptidoglicano si bien es similar, se encuentra fuertemente asociado a la ME y el LPS está unido a proteínas Omp del grupo 3 (Freer y col., 1996).

Dentro de los fosfolípidos que se encuentran con mayor concentración esta la fosfatidilcolina, lo que la diferencia de otras Gram negativas que poseen fosfatidiletanolamina. La estructura del LPS está compuesta por el polisacárido O, el núcleo y el lípido A. En la **figura 1** se describe el esquema de la envoltura de *Brucella*.

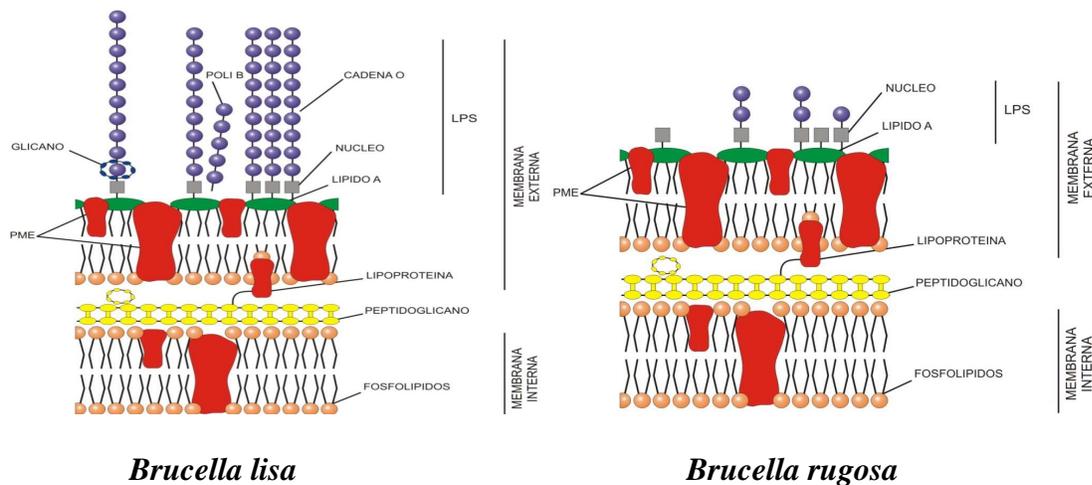


Figura 1. Estructura de la envoltura bacteriana de las brucelas lisas y rugosas. Las cepas rugosas carecen de la cadena O del LPS. Adaptado de *Brucellosis animal*, Blasco J.M. y Gamazo C. Investigación y Ciencia (1994), 218: 56-62

El polisacárido O es capaz de producir reacción cruzada con anticuerpos contra el polisacárido de *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Xanthomonas*

maltophilia y *Francisella tularensis* (Freer y col., 1995) y está formado por un homopolímero lineal con un número de aproximadamente 100 perosaminas. El núcleo del LPS está formado por glucosamina, glucosa, manosa y quinovosamina. El lípido A de *Brucella* tiene un esqueleto disacárido de diaminoglucosa y ácidos grasos, algunos de ellos de cadena larga. Éstos junto con los lípidos de ornitina y fosfatidilcolina contribuyen en la mayor resistencia de la ME a los antibióticos y péptidos catiónicos (Cherwonogrodzky y col., 1990). Otros polisacáridos, como el hapteno nativo (homopolímero de perosamina), se encuentran hidrofóticamente asociados con el LPS.

Las brucelas no son acidorresistentes, aunque pueden resistir a la decoloración por ácidos débiles o por álcalis (Corbel y Morgan, 1984). También son microorganismos aerobios que poseen un metabolismo respiratorio. Algunas cepas exigen suplemento de un 5 a 10% de CO₂ para su crecimiento, en especial para el primer aislamiento. Son exigentes para su crecimiento y requieren agregados de tiamina, nicotinamida, biotina y manganeso (Lucero, 1996).

La supervivencia del género *Brucella* en el medio ambiente varía según las temperaturas y la presencia de humedad: en agua a 37 °C y pH 7,5 se mantiene viable un día; en agua a 8 °C y pH 6,5 57 días; en materia fecal en verano 1 día, mientras que en invierno permanece viable 53 días; en fluidos y secreciones en verano son viables solo por 30 minutos (Castro y col., 2005). En los restos de órganos congelados, las bacterias pueden sobrevivir por muchos años. Los materiales desecados que contengan materia orgánica y estén protegidos de la luz solar pueden tener capacidad de infectar por mucho tiempo. En contraste, son bastante sensibles al calor. Así, una suspensión diluida de *Brucella* se destruye rápidamente al ser sometida a la pasteurización o al exponerla a temperaturas de 60 °C por 30 minutos. *Brucella* es muy sensible a la radiación ionizante y se muere con rapidez al exponerla a la luz ultravioleta (5 minutos). También son sensibles a la mayoría de los desinfectantes de uso común a las concentraciones recomendadas con excepción de las sales cuaternarias de amonio. Como sucede en otras bacterias, la susceptibilidad se reduce en presencia de materia orgánica o a bajas temperaturas. El etanol, isopropanol, iodóforos, hipoclorito de sodio diluido y el fenol al 1% son eficaces para desinfectar la piel expuesta a *Brucella* (World Health Organization, 2005).

1.4 Patogenia

Las especies de *Brucella* pueden sobrevivir y replicarse dentro de las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial como así también en no fagocíticas tales como trofoblastos. Esto implica una temporal fusión de la vacuola que contiene *Brucella* con el lisosoma y la exclusión posterior de las proteínas lisosomales (Star T y col., 2008). Siguiendo éste proceso, la vacuola que contiene *Brucella* se asocia con el retículo endoplásmico. Estos compartimentos (retículo endoplasmático y vacuola con brucelas) son el nicho para la replicación intracelular dentro de los macrófagos, células epiteliales y trofoblastos placentarios. Una vez cumplido este proceso, las bacterias pueden establecer una infección crónica (Anderson y col., 1986a, 1986b, Pizarro y col., 1988, Celli y col., 2003).

Brucella carece de los clásicos factores de virulencia como ser cápsula, presencia de fimbrias, plásmidos y endotoxinas (Gorvel y Moreno, 2002). Algunos de los factores de virulencia como el LPS, enzimas antioxidantes y GMP (guanosina 5' monofosfato) son críticos para la supervivencia dentro de las células fagocíticas (Lapaque y col., 2005, Xiang y col., 2006). Mientras que la persistencia prolongada de *Brucella* en los macrófagos conduce a la infección crónica, la amplia replicación de las bacterias en los trofoblastos placentarios produce síntomas agudos del tracto reproductivo provocando el aborto en huéspedes naturales (Roop y col., 2009).

El ciclo de vida de *Brucella* tiene dos fases: a) la fase aguda, donde invaden las células epiteliales dando patología del tracto reproductivo, b) la fase crónica, donde el microorganismo sobrevive dentro de los fagocitos. La placenta tiene gran cantidad de receptores de manosa y eritritol lo que podría explicar el tropismo de *Brucella* por este órgano (Corbel, 1997).

1.5 Enfermedad en humanos y animales

La brucelosis humana es una de las más importantes zoonosis distribuidas a lo largo del mundo. Aunque *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* son potenciales agentes patógenos, *B. melitensis* es la más virulenta ya que pequeñas cantidades del microorganismo (entre 10 y 100) son suficientes para provocar la infección aguda y crónica (Bossi P, 2004, Fugier y col., 2007). Los veterinarios, personal de frigoríficos, mataderos y de establecimientos ganaderos adquieren la infección a través de lesiones en la piel por contacto con fluidos y abortos de animales infectados (Hartigan P, 1997). El personal de laboratorio puede infectarse a través de aerosoles (por lo cual siempre debe trabajar

en cabina de bioseguridad nivel 2) o por inyección accidental de antígeno durante la producción del mismo (Wallach y col., 2004).

Luego de la exposición a la bacteria, las manifestaciones clínicas pueden aparecer dentro de los 5 a 60 días. Muchos pacientes presentan síntomas generales como fiebre ondulante, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y sudoraciones. Sin embargo, algunos individuos presentan una forma crónica con problemas articulares, espondilitis, artritis, problemas genitourinarios, abscesos y en algunos casos endocarditis (Fugier y col., 2007).

En pequeños rumiantes, *B. melitensis* provoca abortos en el último tercio de la gestación con reducción de la producción de leche en hembras y orquitis en machos. En la mayoría de los casos, la ruta primaria de transmisión de *Brucella* es la placenta, líquidos fetales y las descargas vaginales. La excreción es también común en secreciones de la ubre y en el semen. En algunos casos, se puede aislar *Brucella* de varios tejidos como ser los ganglios linfáticos de la cabeza, los asociados con la reproducción y también de lesiones artríticas (Alton GG y col., 1988).

Los bovinos son afectados por *B. abortus* y esta especie puede afectar también a búfalos, camélidos, cabras y caninos dando cuadros leves y a veces asintomáticos. Después de la infección por *B. abortus*, las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que, por lo general, provoca el aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Incluso en ausencia de aborto se produce una gran excreción de microorganismos a través de la placenta, los líquidos fetales y los exudados vaginales. Las mamas y los ganglios linfáticos regionales también pueden infectarse y los microorganismos pueden aparecer en la leche. Las gestaciones posteriores llegan por lo general a término pero la infección uterina y la mamaria se repiten con un número reducido de microorganismos en los productos del parto y en la leche. En las infecciones agudas, el microorganismo está presente en la mayoría de los ganglios linfáticos. Los machos adultos pueden desarrollar orquitis y la enfermedad puede causar esterilidad en ambos sexos. Una manifestación corriente de la brucelosis bovina en algunos países tropicales son los higromas, por lo general en las articulaciones de las patas, que pueden representar el único indicador de la infección. No es importante la vía venérea como forma de contagio, el mismo se produce por contacto directo con los loquios de abortos y fetos abortados. Tampoco parece ser importante el rol de los machos bovinos en la diseminación de la enfermedad (OIE, 2016).

Los cerdos son afectados por *B. suis* dando síntomas leves o ausentes lo que dificulta su diagnóstico. Cuando la enfermedad es evidente se presentan abortos y síntomas en el aparato

genital. La transmisión es por vía venérea y oral. *B. suis* se libera durante largos períodos por semen y orina. Los machos presentan orquitis, epididimitis y problemas articulares como artritis, discoespondilitis y parálisis. A veces la infección coloniza solo las glándulas sexuales y no hay problemas de fertilidad. Sin embargo, la liberación al exterior sigue teniendo importancia a pesar de no presentar síntomas clínicos evidentes. Las hembras pueden tener abortos en cualquier período de la gestación, pudiendo dar también crías débiles y lechones natimortos (Xavier y col., 2010).

1.6 Brucelosis canina

La brucelosis canina se encuentra distribuida a lo largo del mundo con diferentes prevalencias según el país y la región. En la Argentina existen distintos estudios de prevalencia que oscilan entre el 5 y 12 % de animales serológicamente positivos (Iachini y col., 2004, Delgado y col., 2008, Boeri y col., 2008, López y col., 2009).

B. canis afecta a caninos domésticos y salvajes como zorros y lobos provocando en machos orquitis-epididimitis y edema escrotal (**figura 2 A-B, figura 3**).

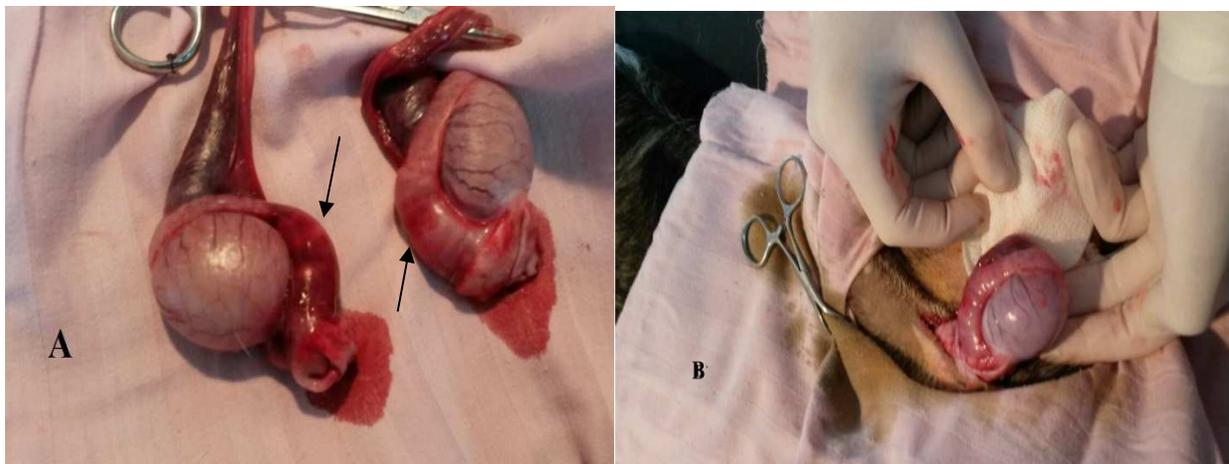


Figura 2 A-B. Epididimitis. Las flechas indican el epidídimo patológico (imagen tomada durante el desarrollo del trabajo)



Figura 3. Dermatitis y edema escrotal (Fuente: presente trabajo)

En hembras falla en la concepción, abortos en el último tercio de la gestación (**Figura 4**), descargas genitales (**Figura 5**) y nacimiento de cachorros débiles los cuales pueden o no sobrevivir.



Figura 4. Aborto tardío (Cortesía: Dr. Gustavo Lopez)



Figura 5 Descarga genital patológica en una hembra (Fuente: presente trabajo)

En ocasiones, los animales nacidos en apariencia sanos, presentan la enfermedad pasada la pubertad. Muchas veces las hembras no presentan signos clínicos evidentes luego del aborto, pudiendo en el ciclo siguiente entrar en celo sin problemas e incluso quedar preñadas presentando o no aborto posterior (Greene y Carmichael, 2012). Este dato es de importancia zoonótica ya que una perra positiva eliminará en el celo cantidades muy altas de brucelas al medio ambiente (1×10^{10} UFC/mL).

En ambos sexos se presenta esporádicamente una discoespondilitis severa (**Figura 6**) provocando en algunos animales paresia con parálisis y dolor importante (Carmichael y col., 1990).

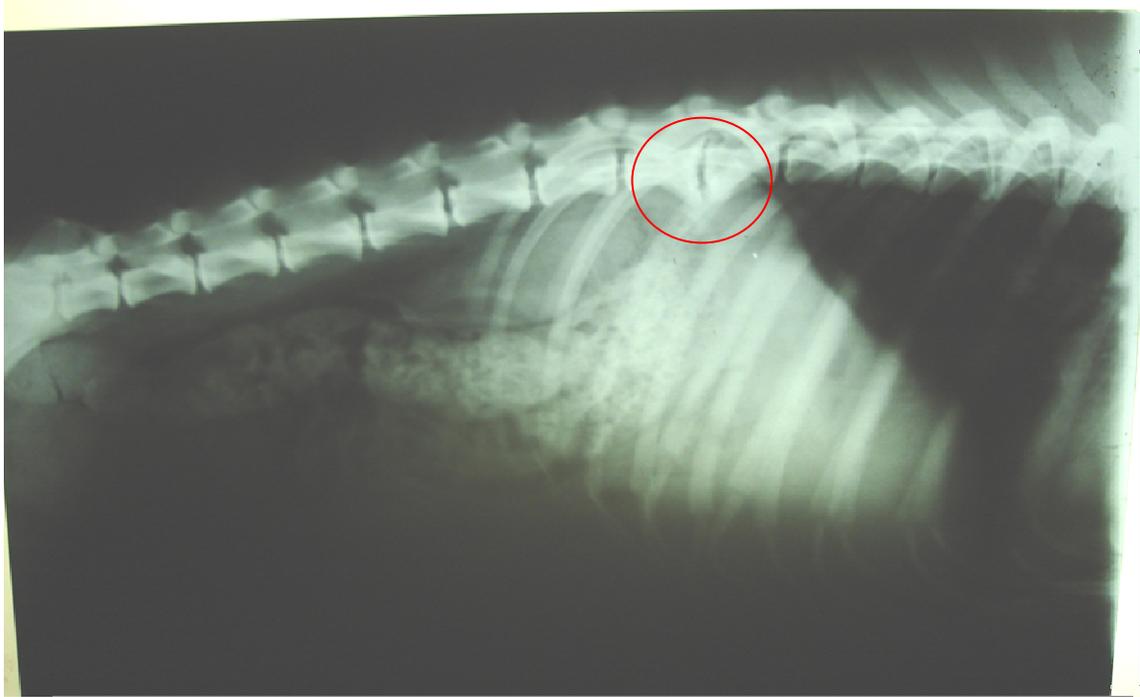


Figura 6. Discoespondilitis severa. El círculo marca la esclerosis y proliferación ósea de la base de las vértebras afectadas. (Imagen tomada durante el desarrollo del presente estudio)

B. canis se ha aislado a partir de animales pertenecientes a criaderos comerciales, refugios y vagabundos. La vía de ingreso es oral y ocular, con una dosis infectiva mínima de 1×10^6 y 1×10^4 UFC/mL respectivamente, existiendo también la transmisión venérea, cuya dosis infectiva no se conoce con exactitud (Carmichael y Joubert, 1988). Las vías de eliminación son por orina especialmente en machos, semen, flujos genitales y material de abortos (Serikawa y col., 1979, Carmichael y Joubert., 1988).

Si bien se sabe que cada especie de *Brucella* tiene afinidad por su hospedador, existen reportes de brucelas lisas aisladas de muestras clínicas y de necropsia. *B. suis* se encontró en caninos que habían estado expuestos durante una cacería de jabalíes (Rammamorty S y col., 2011). Los animales dieron positivos a la prueba de BPA y se logró el aislamiento a partir de testículos en dos casos. También se ha encontrado *B. melitensis* en un canino que tuvo severos síntomas clínicos seguido de muerte. En Grecia (país de donde es el reporte) se utiliza la vacuna *B. melitensis* REV1 para pequeños rumiantes. Los autores concluyeron que pudo haber sido una ingestión de dosis altas de la misma lo que lo llevó al animal a padecer la enfermedad (Hinic V y col., 2009). Por último, *B.*

abortus ha sido aislada en caninos de granjas y establecieron que la puerta de entrada pudo ser vía oral por ingestión de abortos bovinos (Forbes LB, 1990).

1.6.1 Diagnóstico

El diagnóstico se realiza por medio de pruebas serológicas utilizando como técnica de tamiz la aglutinación rápida en placa (RSAT) (Carmichael y col., 1987) y RSAT con el agregado de 2-mercaptoetanol (RSAT 2-ME) debiendo estas ser confirmadas por pruebas más específicas. Para ello, se utiliza el inmunoensayo ligado a enzimas indirecto (iELISA) (Lucero y col., 2002) o la inmunodifusión en gel de agar (AGID) (OIE, 2014). El diagnóstico definitivo es el cultivo bacteriano, considerado como el estándar de oro. Este no siempre se logra ya que, a pesar de los largos períodos de bacteriemia, después de los 6 meses post infección esta se vuelve intermitente (Wanke M.M., 2004).

1.6.2 Zoonosis

B. canis comparada con *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* es menos patógena para el hombre. Sin embargo, su potencial zoonótico es conocido y ha sido descrito en accidentes laborales (Carmichael, 1990, Wallach y col., 2004), personas inmunodeprimidas (Lucero y col., 2010) y brotes familiares (Lucero y col., 2009). El número de personas infectadas con *B. canis* no es muy alto quizás por la falta del diagnóstico (Lucero y col., 2005).

1.7 Reacción en cadena de la polimerasa

Existen en la literatura diferentes ensayos de PCR para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha ido incorporando al diagnóstico buscando como blanco las regiones del genoma más conservadas del microorganismo estudiado, obteniéndose diferentes resultados de acuerdo a la técnica utilizada: PCR a punto final, anidada, multiplex y cuantitativo o a tiempo real.

Cada grupo de investigadores ha ido desarrollando distintos ensayos con potencial aplicación en la práctica en los laboratorios de diagnóstico empleando muestras clínicas y cultivos puros de *Brucella*.

En los primeros tiempos de la PCR, Noordhoek y col. (1993) cuestionaron la posibilidad de repetir resultados en diferentes laboratorios de biología molecular orientados al diagnóstico. Hoy en día, el avance tecnológico ha optimizado el funcionamiento de los mismos para la obtención de resultados similares. El advenimiento de las columnas de extracción de ADN por ejemplo, es una de las grandes ventajas disponible en estos días que minimiza los problemas de amplificación del ADN proveniente de muestras clínicas como por ejemplo, la presencia de inhibidores (Queipo-Ortuño y col., 2008, Tomaso H y col., 2010). Sumado a esto, el avance tecnológico de los termocicladores disponibles ha permitido mejorar los tiempos y el rendimiento de los ensayos diagnósticos mediante PCR.

En 1994, Bricker y Halling desarrollaron un ensayo de PCR multiplex para poder discriminar *B. abortus* biovars 1,2 y 4, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* biovar 1; al que denominaron AMOS. Un año después, los mismos autores incorporaron otros cebadores al ensayo para poder detectar la cepa vacunal *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51 (Bricker y Halling, 1995). Más recientemente, López Goñi y col. (2008), publicaron un trabajo donde incluyeron las cepas clásicas, cepas vacunales y las marinas como *B. ceti* y *B. pinnipedialis*. Dicho trabajo es recomendado por la OIE como prueba rápida para la identificación de especies de *Brucella* (OIE, 2009). Más tarde, Shung y col., (2011) incluyeron cebadores específicos para diferenciar correctamente *B. canis* de *B. suis* en el ensayo de López Goñi (*Bruce ladder multiplex*). López Goñi y col., (2011) mejoraron el trabajo del 2008 incorporando nuevos cebadores que permitieron también, diferenciar correctamente *B. canis* de *B. neotomae* y de los biovars de *B. suis*.

1.7.1 Regiones génicas blancos para el diagnóstico molecular

La secuenciación del genoma completo de *B. melitensis* fue publicado por Del Vecchio y col. (2002) y, en el mismo año, Paulsen y col. (2002) dieron a conocer el de *B. suis*. Más tarde, Halling y col. (2005) describieron el genoma de *B. abortus*, en 2009, Audic y col., (2009) el de *B. microti* y en 2007 se conoció el de *B. canis* (Setubal y col., 2007).

Uno de los primeros genes de *Brucella* en ser clonado y caracterizado como blanco diagnóstico fue la región que codifica para la proteína BCSP31, la cual está conservada en todas las especies de esta bacteria (Mayfield y col., 1988). Basados en ésta región, Baily y col., (1992) diseñaron un ensayo de PCR simple, robusto y sensible. Varios autores utilizaron este protocolo en muestras clínicas de animales y humanos con excelentes valores de sensibilidad y especificidad (Cortez y col., 2001, Gallien y col., 1998, Moratta y col., 1998, Queipo Ortuño y col., 1997). Científicos italianos evaluaron el comportamiento de la PCR desarrollada por Baily empleando muestras de queso blando contaminadas con *Brucella*. Las mismas eran provenientes del uso de leche no pasteurizada y obtuvieron buenos resultados de sensibilidad y especificidad (Serpe y col., 1999).

Luego del trabajo realizado en 1992, otras regiones conservadas de *Brucella* fueron empleadas para el diagnóstico. El gen ribosomal 16S rRNA fue utilizado por Romero y col., (1995a) para detección de diferentes cepas de *Brucella* de laboratorio, vacunales y aislamientos de muestras clínicas humanas y animales. Este estudio incluyó otras bacterias filogenéticamente relacionadas a *Brucella*, siendo el ensayo muy específico en la detección. Más tarde, se descubrió que la región génica del espaciador del 16S-23S rRNA podría brindar regiones aún más específicas que el 16S rRNA (Rijpens y col., 1996). Investigadores del Brasil diseñaron cebadores específicos para esta región génica y encontraron una sensibilidad y especificidad en la detección de un 95% y 100% en muestras de sangre, flujos vaginales y semen de caninos. También, la concordancia fue buena con las pruebas serológicas (Keid y col., 2007a, 2007b, 2010).

En 1989 se descubrieron dos genes codificantes para porinas muy similares: *omp2b* y *omp2a*, los cuales presentan un 85% de homología entre su secuencia (Ficht y col., 1989). En el año 1995, Leal-Klevezas y col., desarrollaron una PCR empleando estos genes para la detección de *Brucella* spp. en muestras de leche y sangre de bovinos. Más tarde, investigadores japoneses diseñaron un ensayo a partir de ese blanco para cultivos puros de *Brucella* (Imaoka y col., 2007).

Otra región conservada empleada en el diagnóstico de *Brucella* es la distribución de secuencias de inserción IS711, la cual presenta la ventaja que todas las especies de *Brucella* contienen al menos 5 y hasta 35 copias del elemento distribuido a lo largo de sus genomas: 7 a 10 en *B. melitensis*, 6 a 8 en *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*, y más de 28 en *B. ovis* (Ouahrani y col., 1993, Halling y col., 1993, Nakkas Al A.F y col., 2002).

Numerosos autores han utilizado la PCR para complementar el diagnóstico en muestras de sangre en humanos (Queipo-ortuño y col., 1997, E. Navarro y col., 2002, Mitka y col., 2007, Baddour y col., 2008, Al-Ajlan HH y col., 2010), en sangre de animales (Leal-Klevezas y col., 1995, Keid y col., 2010) en sueros humanos y animales (Zerva, L. y col., 2001, Keid y col., 2010, Garshasbi y col., 2014) en flujos vaginales y semen en caninos (Keid y col., 2007a, 2007b). Otros reportes evaluaron diferentes genes mediante PCR para la detección de *Brucella* spp. en desordenes reproductivos con muestras de distintas especies animales. Un estudio incluyó cabras, búfalos, bovinos y un solo canino y se evaluaron a partir de cultivos de *Brucella* por medio de PCR (Ghudasara y col., 2010).

Investigadores españoles utilizaron un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) en 10 muestras clínicas de orina de pacientes humanos amplificando el gen codificante para BCSP31 encontrando resultado positivo solo en uno de los casos (Queipo-ortuño y col., 2006). Más recientemente, Kauffman y col., (2014) evaluaron 165 muestras de sangre, 65 de flujos y 6 de orina de caninos mediante qPCR, amplificando el gen *omp25*. El gen codificante para BCSP31 ha sido evaluado recientemente para la detección de *Brucella* spp en orina de caninos con excelentes resultados al ser contrastados con el urocultivo (Boeri y col., 2016).

HIPÓTESIS

y

OBJETIVOS

2. HIPOTESIS

La sensibilidad y especificidad para la detección de *Brucella* spp. en caninos difiere según el gen amplificado por PCR estándar y la muestra clínica empleada.

2.1 OBJETIVO GENERAL

En la literatura no se encuentra descrito un ensayo comparativo de distintos genes para la detección de *Brucella* spp. en muestras clínicas de sangre, flujos y orina de caninos. En vista de los antecedentes explicados, el objetivo de este estudio fue:

- ✓ Comparar la sensibilidad (S), especificidad (Esp) y razón de verosimilitud positiva (RV+) de 4 ensayos de PCR para la detección de *Brucella* spp. en diferentes muestras clínicas de caninos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Estimar la sensibilidad y especificidad analítica de los 4 ensayos de PCR en muestras clínica de sangre, flujo y orina de caninos.
- ✓ Estimar la fuerza de concordancia de cada ensayo de PCR respecto al *Gold Estándar* establecido.
- ✓ Evaluar la exactitud diagnóstica de los 4 ensayos de PCR por medio del empleo de curvas ROC.
- ✓ Determinar cuál ensayo de PCR fue el más útil para el diagnóstico molecular de brucelosis canina.

MATERIALES

y

MÉTODOS

3.1 Diseño, población y muestras

Se realizó un estudio comparativo observacional transversal a muestras relacionadas durante el período octubre 2013 /octubre 2015 en caninos machos y hembras de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y de diferentes zonas de la provincia de Buenos Aires. Fueron muestreados animales entre 8 meses y 9 años de edad cuya procedencia fue la siguiente: caninos que concurren al Servicio de Cirugía del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur (IZLP) de CABA; caninos provenientes de criaderos comerciales con presencia de la enfermedad y libres de la misma; por último, caninos de refugios y de veterinarias privadas de CABA. No se incluyeron aquellos que presentaran signos clínicos de enfermedades no compatibles con brucelosis ni los que estuvieran bajo tratamiento con antibiótico. Las muestras fueron tomadas en forma consecutiva hasta alcanzar un número equilibrado de 299 enfermos y 299 sanos, trabajándose con un intervalo de confianza del 95% y un error del 5% (programa OpenEpi, versión 3.01). Las mismas fueron procesadas por diferentes operadores asegurando de este modo las mediciones cegadas e independientes. Se obtuvo sangre entera de machos y hembras, flujos genitales de hembras y orina de machos. Los datos se volcaron en un ficha conteniendo la siguiente información: a) datos del propietario/tenedor responsable: dirección / teléfono / barrio/zona / localidad y b) datos relacionados con el canino: Sexo (macho/hembra) / Edad (en años según lo referido por el responsable) / Raza (específica/ indefinido/ mestizo).

Previa explicación del objetivo del estudio a los propietarios de los animales, se realizó el consentimiento escrito para la toma de muestras.

Los caninos del IZLP fueron muestreados una vez anestesiados y listos para la intervención quirúrgica, los de los criaderos se sujetaron en forma segura (colocación de bozal y uso de collar y correa) por los cuidadores del establecimiento, los animales de refugios por los trabajadores del lugar y los de casas particulares con la ayuda de los propietarios. Primero se procedió a rasurar la zona de la gotera yugular, se limpió con alcohol al 70% y se embrocó con iodopovidona al 10% para la extracción de sangre en forma aséptica. Con jeringa de 10 mL y aguja 25/8 se punzó la vena yugular, una vez obtenida la sangre se cambió la aguja por una nueva para luego colocar 2 mL en un tubo para hemocultivo al lado de una llama, conservando a temperatura ambiente hasta su siembra bacteriológica.

Luego se descartó la aguja y se colocaron 900 μ L (microlitros) en un tubo libre de ARNasas conteniendo 100 μ L de citrato de sodio al 2,5% como anticoagulante para la prueba de PCR. Se conservó refrigerado a 4 °C hasta su procesamiento.

En ambos casos se homogeneizó bien la muestra para evitar la coagulación. Luego se colocaron 3 ml en un tubo limpio y seco para pruebas serológicas, centrifugándose de inmediato para evitar la hemólisis. Para las muestras de orina se obtuvo 6 ml por sondaje vesical utilizando sonda K-30 o K-33 (según el tamaño del animal) colocando 3 ml en un tubo estéril para bacteriología y 1,5 ml en tubo libre de ARNasas para PCR (por duplicado), completando un total de 3 ml de orina. Se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento. Con un hisopo de dacrón se realizaron hisopados vaginales colocándolos en un tubo para PCR conteniendo buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM disodium EDTA pH 8.0) para su conservación y posterior procesado.

3.2 Método Gold estándar

Se siguieron los pasos metodológicos para valoración de test diagnósticos (Castiglia, 1998) definiendo en primer lugar el Gold Estándar (GE) para poder contrastar los ensayos de PCR. Para esto, se tomó la combinación de los resultados diagnósticos hallados en las pruebas serológicas y bacteriológicas, teniendo en cuenta también los signos clínicos compatibles con brucelosis canina y epidemiología compatible. Se detallan a continuación:

- RSAT: como técnica de tamiz, con antígenos de referencia del Instituto Malbrán o SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal) se empleó la cepa *B. canis* variante M- (Carmichael y col., 1987).
- AGID: utilizando la cepa de *B. ovis* REO 198 (OIE, 2014).
- IELISA: de acuerdo al protocolo descripto (Lucero y col., 2002).
- RSAT 2-ME: de acuerdo al protocolo descripto (Carmichael y col., 1987).
- Aislamiento bacteriano: para bacteriología se llevaron a cabo las recomendaciones bibliográficas (Alton y col., 1988), realizándose cultivos de sangre entera y orina.
- Aglutinación con antígeno tamponado en placa (BPA). Es la prueba para detectar anticuerpos anti brucelas lisas. Se realizó siguiendo los procedimientos estandarizados (Angus y col., 1984).

- Epidemiología compatible:
 - ✓ Convivencia con animales positivos
 - ✓ Origen: de criadero / refugio / vía pública / casa particular
 - ✓ Antecedentes de servicios no testeados previamente
 - ✓ Estada en pensionado
 - ✓ Salida con paseador
 - ✓ Hábitos: se clasificó a partir de la información referida por el responsable en :
 - a. *domiciliario*: no sale o lo hace con correa
 - b. *peri domiciliario*: sale con supervisión
 - c. *vagabundo*: sin dueño, callejero
 - ✓ Antecedentes de servicios: si / no sabe

Se consideró como epidemiología compatible con brucelosis canina el cumplimiento de uno o más de los ítems antes descritos.

- Síntomas compatibles con brucelosis canina:
 - ✓ presencia de orquitis / epididimitis
 - ✓ atrofia testicular
 - ✓ dermatitis escrotal
 - ✓ muerte embrionaria
 - ✓ falla en la concepción
 - ✓ aborto
 - ✓ muerte perinatal
 - ✓ cachorros natimortos
 - ✓ cachorros débiles
 - ✓ disco espondilitis

3.2.1 Definición de animales sanos y enfermos

Se definió como sano a todo canino negativo a las pruebas serológicas y bacteriológicas, en conjunto con la ausencia de signos y síntomas clínicos compatibles con brucelosis canina. A su vez, se definió como enfermo a todo canino que cumpliera con la combinación de diferentes pruebas diagnósticas siguiendo los patrones que se muestran en la **tabla 2**.

TABLA 2. Combinación de pruebas para definir el GE establecido.

RESULTADO PATRON ORO	pos	neg	neg									
RSAT	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-
AGID	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
IELISA	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RSAT 2-ME	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Aislamiento bacteriano	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-
Signos compatibles con <i>Brucella</i> spp.	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-
Epidemiología compatible	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+	+	+	-	-

pos: positivo, **neg:** negativo, **+**: positivo, **-**: negativo

3.3 Pruebas moleculares para detección de *Brucella* spp.

La extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) se realizó con columnas de extracción High Pure PCR Template preparation kit Roche-applied-science siguiendo el protocolo del fabricante. Luego de obtenido el ADN purificado, se procedió a medir la concentración del mismo en un equipo Nanodrop ND1000 para saber la cantidad exacta a utilizar en cada reacción de PCR (30 – 50 ng/μL).

La **tabla 3** muestra los termociclados utilizados para la amplificación de ADN de cada ensayo de PCR.

Tabla 3. Termociclados realizados con cada par de cebadores.

Cebadores	Desnaturalización inicial	Ciclos	Extensión final
B4 B5	95 °C 5 minutos	94 °C 60 segundos 62 °C 60 segundos 72 °C 60 segundos Total: 35 ciclos	72 °C 10 minutos
ITS66 ITS279	95 °C 2 minutos	95 °C 30 segundos 62 °C 30 segundos 72 °C 30 segundos Total : 40 ciclos	72 °C 5 minutos
JPF JPR ca	95 °C 5 minutos	95 °C 60 segundos 65 °C 60 segundos 72 °C 60 segundos Total : 35 ciclos	72 °C 7 minutos
O1 O2	93 °C 45 segundos	93 °C 60 segundos 69 °C 60 segundos 72 °C 60 segundos Total : 35 ciclos	72 °C 1 minuto

Para las reacciones se utilizó un Termociclador Eppendorf Mastercycler personal.

La amplificación del ADN se llevó a cabo en tubos con 25 µL de volumen final por reacción conteniendo: 0,5 µM de cada cebador (*forward/reverse*), 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 5 µL de buffer 5X con cloruro de magnesio a una concentración final por reacción de 1,5 mM (PROMEGA 5X Green GoTaq® Flexi Buffer Migration Pattern) y 1 UI/ mL de *Taq* ADN Polimerasa. Cuando fue posible, se utilizó como control interno de PCR los iniciadores para amplificar un segmento de 86 pb (pares de bases) del exón III del gen de beta-actina humana (mini beta actina), (Secuencia de cebadores 5`-3`: *Forward*: GAG ACC TTC AAC ACC CCA G / *Reverse*: ATC ACG ATG CCA GTG GTA C) (Byodinamics SRL) colocando 0,5 µM de cada cebador. La cantidad de ADN por tubo fue entre 30 a 50 ng/µL de acuerdo a las mediciones obtenidas luego de la extracción. Como control positivo de la reacción de amplificación por PCR se utilizó ADN purificado a partir de la cepa *B. canis* RM6/66 a una concentración de 30 ng/µL y como control negativo de reacción se emplearon 5 µL de agua ultra pura para biología molecular.

Los amplicones obtenidos fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5% conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Para cada reacción de PCR evaluada se sembraron 10 µL por calle respetándose el siguiente orden: control negativo de extracción de ADN, muestras, control negativo de PCR, control positivo de PCR y el marcador de peso molecular (MpM) en la última calle. Se realizó una corrida electroforética a 100 voltios constante durante 30 minutos en buffer TAE. (Tris-

acetato-EDTA). La visualización se realizó empleando un transiluminador de luz UV. Finalmente las corridas fueron registradas empleando una máquina fotográfica kodak Easy Share Z7590 con filtro para luz UV.

3.3.1 Genes / regiones génicas amplificados por PCR

1. **Cebadores B4/B5 (PCR 1)**, amplifica la región codificante para BCSP31.
2. **Cebadores ITSS66 / ITSS279 (PCR 2)**, amplifica la región del espaciador 16S-23S rDNA.
3. **Cebadores JPF/JPR ca (PCR 3)**, amplifica la región *omp2a* y *omp2b*.
4. **Cebadores O1/O2 (PCR 4)**, amplifica la región IS711.

Tabla 4. Cebadores utilizados con la región que amplifica y el tamaño del amplicón obtenido.

Cebador	Secuencia (5`-3`)	Región génica blanco	Tamaño del amplicón	Referencia
B4	tggctcggttgccaatatcaa	BCSP31	223 pb	Baily y <i>col.</i> , 1992
B5	cgcgcttgcccttcaggctctg			
ITS66	acatagatcgcaggccagtca	16S-23S rDNA del espaciador	214 pb	keid y <i>col.</i> , 2007
ITS279	agataccgacgcaaacgtac			
JPF	cgcctcaggctgccgacgcaa	<i>omp2b omp2a</i>	187 pb	Imaoka y <i>col.</i> , 2007
JPR ca	cctttacgatccgagccgta			
O1	tccgcaagcttcaagccttctatcc	IS711	325 pb	Nakkas y <i>col.</i> , 2002
O2	gcgtgtctgcattcaacgtaacc			

Para todos los ensayos de PCR se consideró negativo la falta de observación directa de la banda en el gel de agarosa y positivo a la banda observada a la misma altura que el control positivo.

3.3.2 Sensibilidad analítica (límite de detección)

Se realizó una re suspensión en TSB (Tris buffer salino) de una colonia aislada de *B. canis* RM6/66 y 100 µL por placa de la misma fueron luego sembrados en agar triptosa e incubadas a 37 °C durante tres días. Las bacterias fueron cosechadas empleando 3 mL/placa de TSB y colectadas en un tubo cónico de 15 mL. Luego se separaron por centrifugación a 4.000 g durante 5 minutos. El pellet fue re suspendido de manera homogénea en 4,5 mL de TSB. Finalmente, alícuotas de 750 µL/tubo fueron conservadas en tubos de 1,5 mL a -80 °C. La determinación de la concentración del inóculo fue realizada una semana después mediante la siembra en medio agar triptosa de diluciones seriadas al décimo.

Una vez obtenido el recuento de bacterias, que dio como resultado $1,8 \times 10^{10}$ UFC/mL (Unidad formadora de colonias por mililitro), se realizó la sensibilidad analítica a las tres muestras clínicas para establecer el límite de detección de cada ensayo de PCR siguiendo las recomendaciones descriptas (OIE, 2014).

3.3.2.1 Sangre

La muestra de sangre empleada fue tomada a partir de un animal sano y para la obtención de las distintas concentraciones seriadas se procedió de la siguiente manera: 50 µL de la cepa fueron colocadas en un tubo con 450 µL de sangre mezclada con citrato de sodio al 2,5 %, obteniéndose así la dilución de 1×10^9 UFC/mL. Luego, se tomaron 50 µL de la sangre infectada (dilución 1×10^9 UFC/mL) y se colocaron en un nuevo tubo conteniendo 450 µL de sangre, obteniendo la dilución 1×10^8 UFC/mL y así sucesivamente hasta llegar a 1×10^{-1} UFC/mL para luego extraer el ADN de cada uno de los tubos con las diferentes concentraciones de *Brucella*.

3.3.2.2 Flujos

La muestra de flujos genitales fue obtenido de una hembra sana y para la obtención de las distintas concentraciones seriadas se realizó lo siguiente: se tomaron 50 µL de la cepa $1,8 \times 10^{10}$ UFC/mL y se colocaron en un tubo conteniendo 450 µL de flujo, obteniéndose así la dilución de $1,8 \times 10^9$ UFC/mL por diluciones seriadas al décimo y siguiendo igual protocolo que el descripto previamente para sangre entera.

3.3.2.3 Orina

La muestra de orina empleada fue colectada de un animal sano y con la misma se realizó el siguiente protocolo: se tomó una alícuota de 500 μL de la cepa $1,8 \times 10^{10}$ UFC/ml colocándola en 4.500 μL de orina obteniéndose así la dilución 1×10^9 UFC/mL. A partir de la misma se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta llegar a 1×10^{-1} UFC/mL, de la misma forma que para las muestras de sangre. Luego se transfirió una alícuota de 1 ml de la orina infectada del tubo correspondiente a la dilución $1,8 \times 10^9$ UFC/mL a un tubo nuevo vacío y se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Se adicionó una nueva alícuota de 1 ml de orina de la misma dilución y se repitió este paso tres veces más asegurando así la obtención del *pellet* visible. El mismo fue resuspendido con 200 μL de buffer fosfato salino (PBS) estéril y utilizado luego como muestra para la extracción de ADN.

3.3.3 Especificidad analítica

Los 4 ensayos de PCR se realizaron con ADN de bacterias emparentadas filogenéticamente con *Brucella* para establecer la especificidad analítica (cepas pertenecientes a la Colección de Cultivos del Servicio Antígenos y Antiseros del INPB (Instituto Nacional de Producción de Biológicos - ANLIS "Carlos G. Malbrán"). Las bacterias empleadas fueron: *Escherichia coli* (EC 0304), *Shigella flexneri* (SHI 0086) y, *Salmonella enteritidis* (SAL 0176).

3.4 Índice de concordancia de los 4 ensayos de PCR

Se calculó el coeficiente kappa utilizando el programa Epidat 4.0 y para los valores de fuerza de concordancia se siguieron las recomendaciones de Altman (1991).

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Epidat versión 3.1 para tablas de 2x2 y gráficos de curvas ROC. Se evaluó la sensibilidad, especificidad y RV+ de cada PCR con las tres muestras (sangre-flujos-orina) con los respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95) para

poder comparar los resultados (Johnson, 2004, Gardner y Greiner, 2006). Para establecer si hubo o no diferencias significativas entre los ensayos respecto del área bajo la curva (ABC) de las curvas ROC, se realizó el análisis de la varianza a mediciones repetidas (ANOVA) utilizando el programa WinPepi versión 11.43. (Copyright J Abramson 7 de julio 2014).

RESULTADOS

4.1 Muestras

Fueron evaluadas 244 muestras de sangre, 101 de orina y 250 de flujos, dando un total de 595 entre animales sanos y enfermos. La muestra fue equilibrada para poder obtener los valores de cribaje de los 4 ensayos de PCR contrastados con el GE. Se muestrearon un 70,75 % de hembras (421/595) y un 29,24 % de machos (174/595). El origen de los animales fue el siguiente: criadero comercial 33,10% (197/595), refugio 9,24% (55/595), casa particular 48,90 (291/595), encontrado en la vía pública 8,73% (52/595). Se registraron síntomas clínicos compatibles en un 9,41% (56/595) y epidemiología compatible en un 50,42% (300/595).

4.2 Pruebas serológicas y bacteriológicas de los animales sanos

De la totalidad de animales muestreados, 297 correspondieron a animales sanos con resultado negativo a las pruebas serológicas de BPA y RSAT como así también a los hemocultivos y urocultivos realizados.

4.3 Pruebas serológicas y bacteriológicas de animales enfermos

Al total de los 298 animales positivos al GE se les realizó la prueba de BPA y RSAT. La primera dio negativo el 100% (298/298) es decir, ningún animal tuvo anticuerpos anti brucellas lisas. La segunda arrojó un 74,16% (221/298) de positivos. Cuando fue posible, se realizó la prueba de RSAT-ME encontrando un total de 31,21% (69/221) de positivos. Igual situación ocurrió con la prueba de iELISA detectando un 87,17% (34/39) de sueros positivos. La prueba de AGID se realizó en 50 sueros obteniendo un 62% de positivos (31/50). A todos los animales se les realizó hemocultivo (a machos y hembras) y urocultivo (solo a los machos) obteniendo los siguientes resultados: hemocultivo 19,12% (57/298) positivos y 2,01% (6/298) contaminados. Urocultivo 16,43% (12/73) positivos y 5,47% (4/73) contaminados.

4.4 Manifestaciones clínicas y epidemiología compatible de los animales enfermos

Dentro de los 298 positivos al GE, el 84,56% (252/298) tuvo epidemiología compatible y el 18,45% (55/298) tuvo sintomatología compatible.

En la **figura 7** se muestran los síntomas clínicos hallados en 55 de los 298 animales positivos al GE. Se observa que el aborto fue el síntoma más prevalente seguido por infertilidad, epididimitis, cachorros natimortos y discoespondilitis.

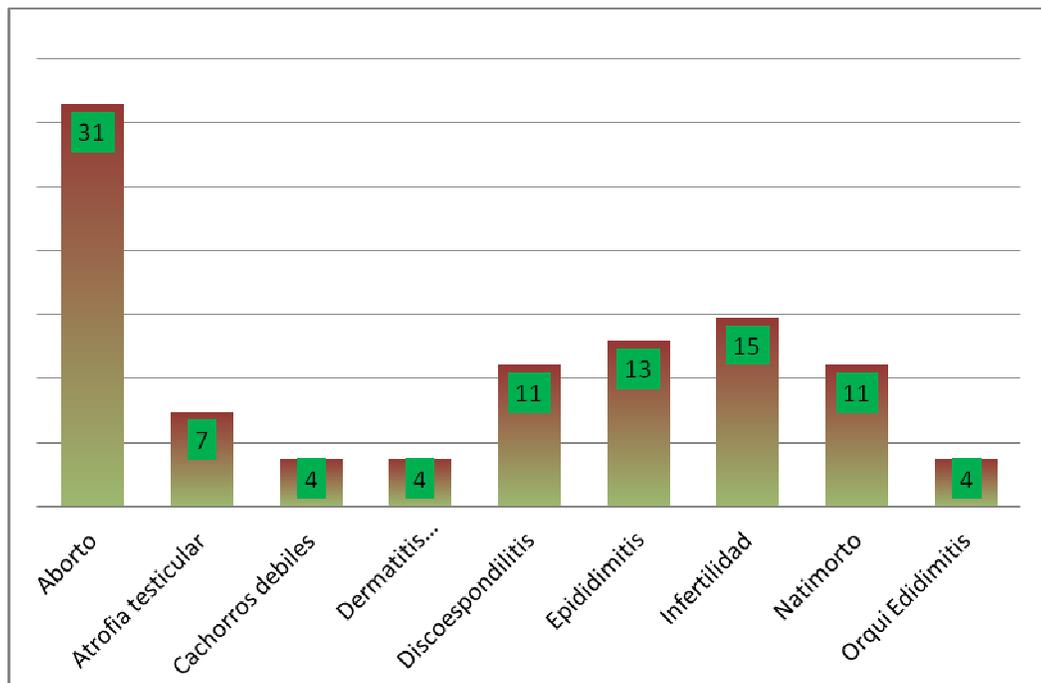


Figura 7. Gráfico de la distribución de los signos clínicos hallados en 55 de los 298 perros positivos al GE expresada en porcentaje.

4.5 Sensibilidad analítica / límite de detección

La patogenia de la brucelosis canina hace predilecta la elección de sangre, flujo genital y orina como muestra para el diagnóstico molecular. Cada una de las mismas posee una matriz con una composición global definida que difiere entre sí. Para evaluar el efecto de la matriz de la muestra en la amplificación de ADN de *Brucella*, se emplearon las muestras antes mencionadas sobre las cuales se determinó la eficiencia de las PCR y posibles efectos en la amplificación.

4.5.1 Sensibilidad analítica en muestras de sangre

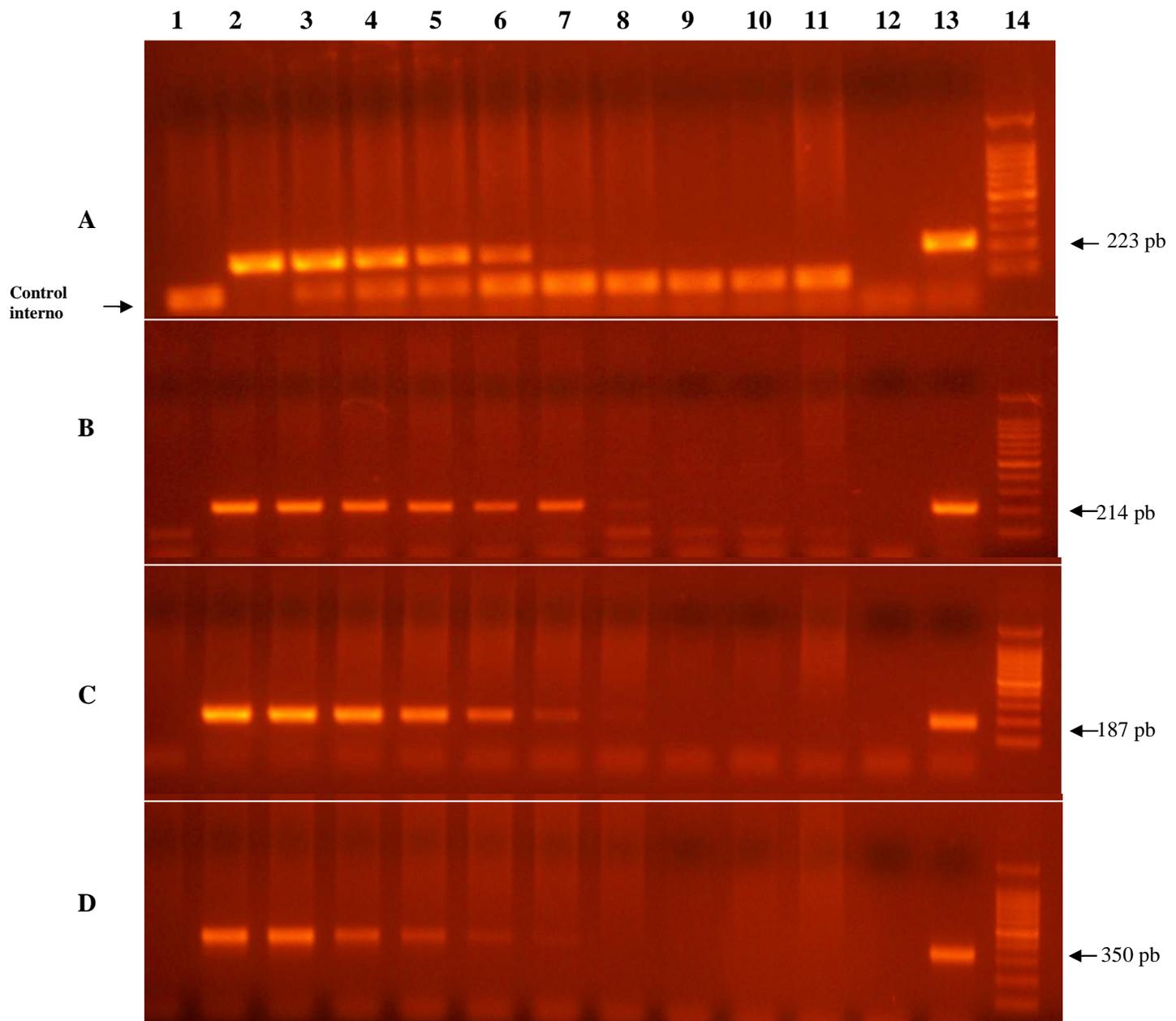


figura 8. Determinación de la sensibilidad analítica en muestras de sangre. Línea 1: Control negativo de extracción de ADN, líneas 2 a 11: dilución $1,8 \times 10^9$ a $1,8 \times 10^0$ UFC/ml, línea 12: Control negativo de PCR, línea 13: Control positivo de PCR, línea 14: MpM 100 pb DNA Roche xiv 11721933001. Las flechas sobre el lado derecho muestran el tamaño del amplicón de cada par de cebadores. Del lado izquierdo se observa la flecha que marca el Control interno de PCR.

La **figura 8A** muestra el límite de detección de los cebadores B4/B5. Se puede observar una banda visible hasta la dilución $1,8 \times 10^4$ UFC/mL. La **figura 8B** muestra los cebadores ITS66/ITS2279 observándose banda visible hasta $1,8 \times 10^3$ UFC/mL. La **figura 8C** muestra los

cebadores JPF/JPR ca viéndose banda visible hasta $1,8 \times 10^3$ UFC/mL y por último, la **figura 8D** muestra la sensibilidad analítica de los cebadores O1/O2 con una banda visible hasta $1,8 \times 10^4$ UFC/mL.

4.5.2 Sensibilidad analítica en muestras de flujos genitales

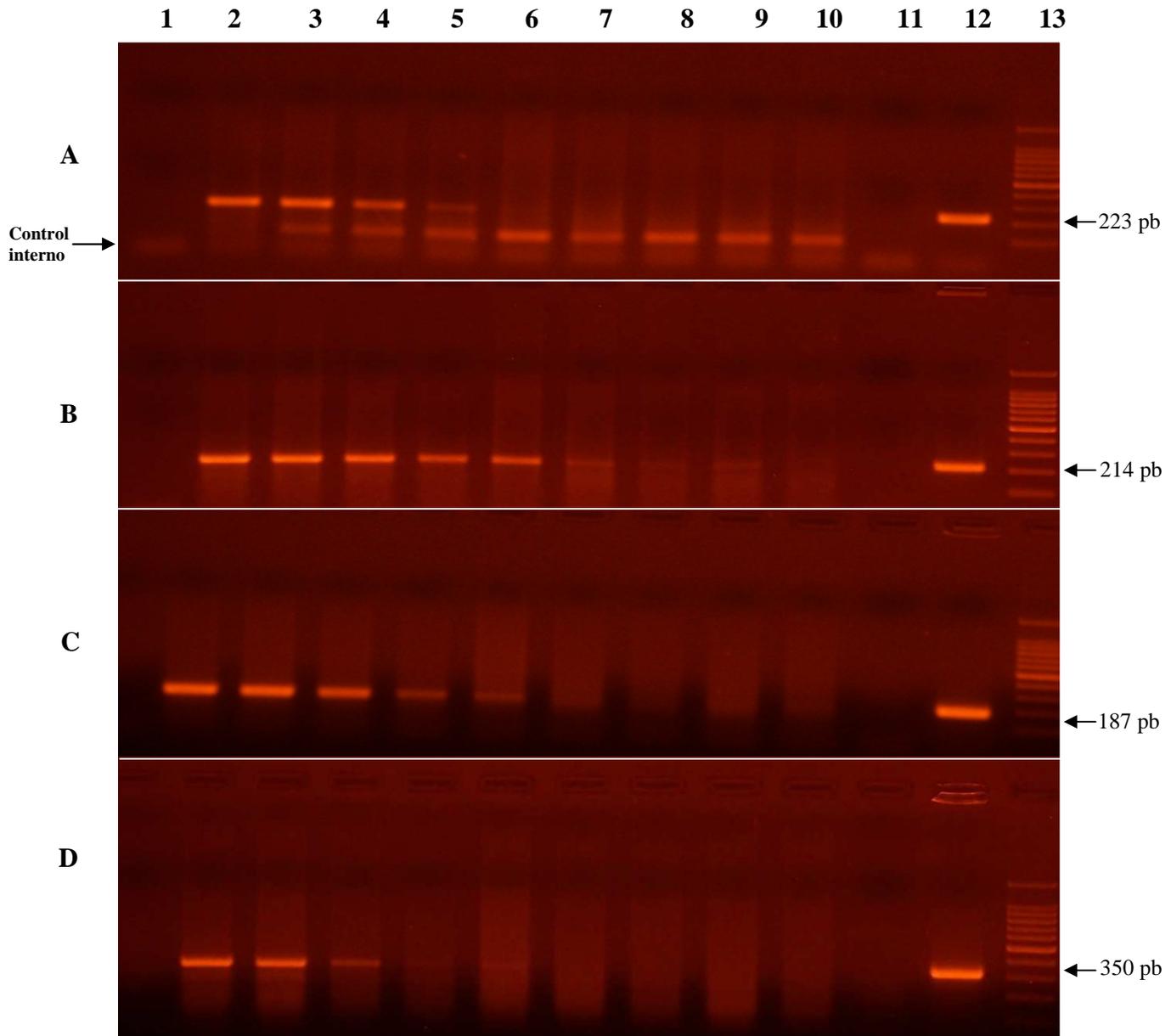


figura 9. Determinación de la sensibilidad analítica en muestras de flujos genitales. Línea 1: Control negativo de extracción de ADN, líneas 2 a 10: dilución $1,8 \times 10^9$ a $1,8 \times 10^1$ UFC/mL, línea 11: Control negativo de PCR, línea 12: Control positivo de PCR, línea 13: MpM 100pb DNA Roche xiv 11721933001. Las flechas sobre el lado derecho muestran el tamaño del amplicón de cada par de cebadores. Del lado izquierdo se observa la flecha que marca el Control interno de PCR.

La **figura 9A** muestra el límite de detección de los cebadores B4/B5 observándose banda visible hasta la dilución $1,8 \times 10^6$ UFC /mL. En la **figura 9B** los cebadores ITS66/ITS2279 muestran banda visible hasta $1,8 \times 10^2$ UFC/mL. La **figura 9C** muestra los cebadores JPF/JPR ca los cuales arrojan una banda visible hasta $1,8 \times 10^5$ UFC/mL. La **figura 9D** presenta a los cebadores O1/O2 con una banda visible hasta $1,8 \times 10^5$ UFC/mL.

4.5.3 Sensibilidad analítica en muestras de orina

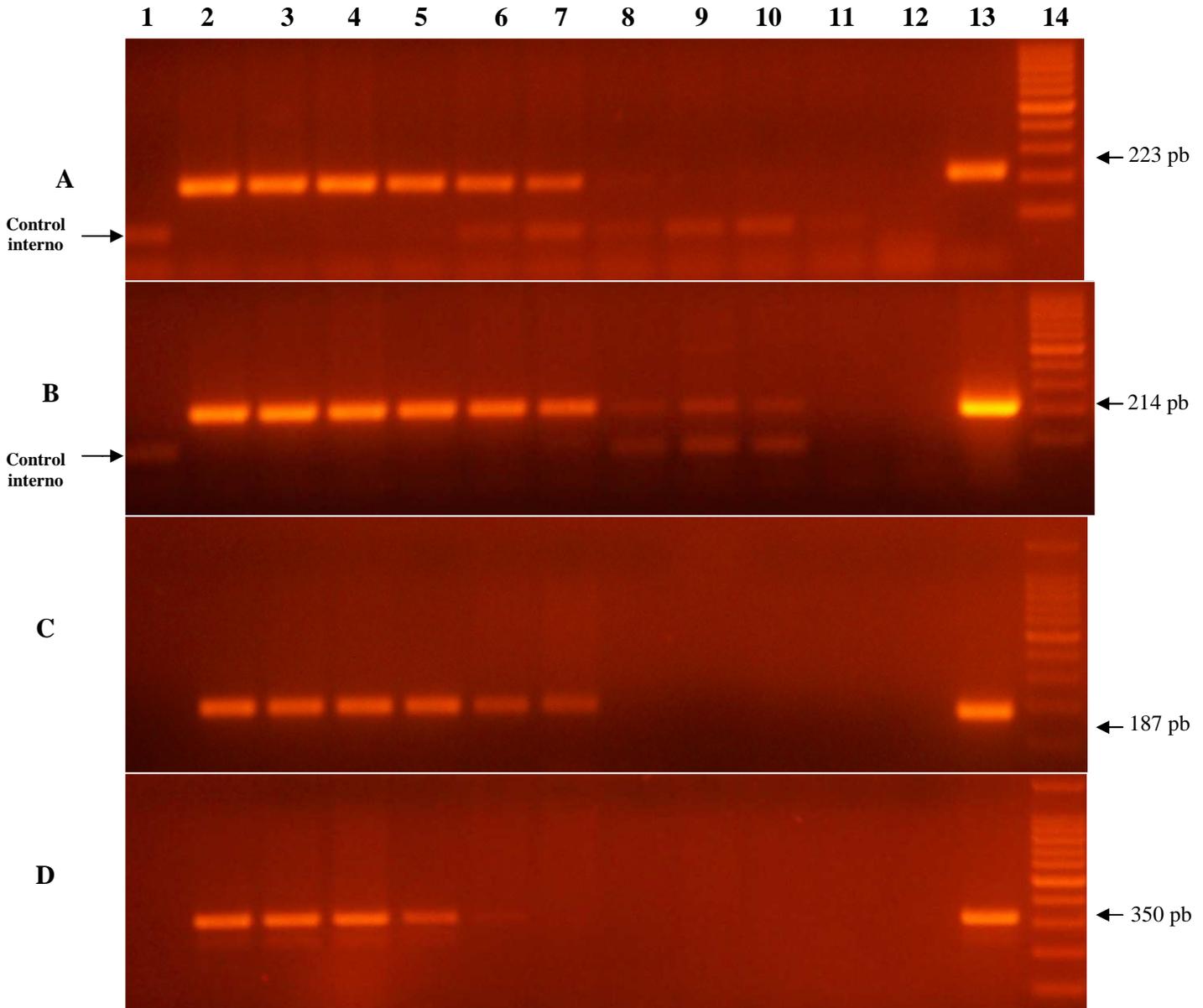


figura 10. Determinación de la sensibilidad analítica en muestras de orina. Línea 1: Control negativo de extracción de ADN, líneas 2 a 11: dilución $1,8 \times 10^8$ a $1,8 \times 10^{-1}$ UFC/mL, línea 12: Control negativo de PCR, línea 13: Control positivo de PCR, línea 14: MpM 100pb DNA Roche xiv 11721933001. Las flechas sobre el lado derecho muestran el tamaño del amplicón de cada par de cebadores. Del lado izquierdo se observa la flecha que marca el Ci de PCR.

La **figura 10A** muestra el límite de detección de los cebadores B4/B5 observándose banda visible hasta la dilución $1,8 \times 10^2$ UFC/mL. La **figura 10B** muestra los cebadores ITS66/ITS2279 los cuales arrojan banda visible hasta $1,8 \times 10^0$ UFC/mL. La **figura 10C** muestra los cebadores JPF/JPR ca los cuales permiten ver banda visible hasta $1,8 \times 10^3$ UFC/mL y la **figura 10D** O1/O2 banda visible hasta $1,8 \times 10^4$ UFC/mL.

La banda de PCR del control interno se puede ver en las figuras 8, 9 y 10 A y figura 10B. Se observa que a medida que el target de ADN bacteriano disminuye, aumenta la visualización del control interno.

Para una mejor visualización, los resultados de sensibilidad analítica obtenidos para cada grupo de cebadores en los tres tipos de muestra son mostrados en la **tabla 5**.

Tabla 5. Límite de detección de los 4 pares de cebadores expresado en UFC/mL

CEBADOR	MUESTRA		
	SANGRE	FLUJO	ORINA
B4/B5	$1,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^2$
ITS66/ITS279	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^0$
JPF/JPR ca	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$
O1/O2	$1,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$

Se puede observar que el límite de detección en sangre fue de $1,8 \times 10^3$ UFC/mL para los cebadores ITS66/ITS279 y JPF/JPR ca, seguidos por $1,8 \times 10^4$ UFC/mL en B4/B5 y O1/O2. En muestras de flujo, los cebadores ITS66/ITS279 detectaron $1,8 \times 10^2$ UFC/mL mientras que JPF/JPR ca y O1/O2 detectaron $1,8 \times 10^5$ UFC/mL. Los cebadores B4/B5 detectaron $1,8 \times 10^6$ UFC/mL. Por último, en orina, la mejor detección fue para los cebadores ITS66/ITS279 con $1,8 \times 10^0$ UFC/mL, seguido por B4/B5 con $1,8 \times 10^2$ UFC/mL. En tercer lugar, los cebadores JPF/JPR ca con $1,8 \times 10^3$ UFC/mL y finalmente O1/O2 con $1,8 \times 10^4$ UFC/mL.

Los resultados obtenidos corresponden al empleo como matriz de muestras provenientes de animales negativos. Es importante tener presente que la composición de la matriz se verá modificada ante la presencia de la enfermedad y que los límites de sensibilidad antes mencionados podrían variar.

4.6 Especificidad analítica

Con el objetivo de reevaluar la especificidad analítica y utilizando los cebadores descritos en la **Tabla 4**, se realizó la amplificación mediante PCR del ADN obtenido a partir de microorganismos filogenéticamente relacionados con *Brucella*: *Escherichia coli* (EC 0304), *Shigella flexneri* (SHI 0086), *Salmonella enteritidis* (SAL 0176). La **figura 10** muestra los resultados de la especificidad analítica realizada.

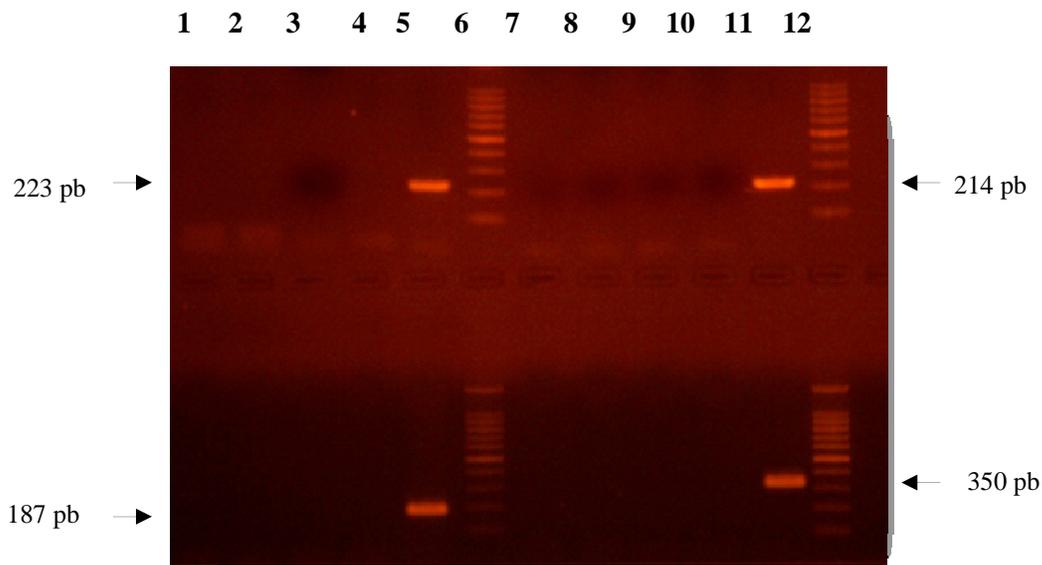


Figura 11. Especificidad analítica de los 4 grupos de cebadores estudiados. Línea 1: cepa *Escherichia coli*, línea 2: cepa *Shigella flexneri*, línea 3: cepa *Salmonella enteritidis*, líneas 4 y 10: control negativo de PCR, línea 5 y 11: control positivo de PCR, línea 6 y 12: MpM, línea 7: cepa *Escherichia coli*, línea 8: cepa *Shigella flexneri*, y línea 9: cepa *Salmonella enteritidis*, **Fila superior.** Líneas 1 a 5: cebadores B4/B5, líneas 7 a 11: cebadores ITS66/ITS279. **Fila inferior.** Línea 1 a 5: cebadores JPF/JPR ca, línea 7 a 11: cebadores O1/O2. Las flechas indican el tamaño de la banda de PCR de cada ensayo.

Los resultados obtenidos concuerdan con los esperados y previamente publicados (Baily y col., 1992, Keid y col., 2007a, Nakkas y col., 2002, Imaoka y col., 2007), demostrándose la especificidad de los cebadores al género *Brucella*.

4.7 Índice de concordancia entre los 4 ensayos de PCR

Para determinar la reproducibilidad de las pruebas de PCR, se estimó la fuerza de concordancia entre los diferentes ensayos estudiados y el GE establecido previamente. Se calculó el índice de concordancia (índice kappa) con sus respectivos IC, el cual se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Concordancia entre los 4 ensayos de PCR y el GE.

PCR	Índice Kappa	Intervalo de confianza	Fuerza de concordancia
PCR 1	0,42	0,339-0,485	Moderada
PCR 2	0,637	0,575-0,699	Buena
PCR 3	0,365	0,291-0,440	Débil
PCR 4	0,483	0,431-0,535	Moderada

En la **tabla 6** se puede ver que la PCR 2 tuvo una fuerza de concordancia buena seguida por la PCR 1 y 4 con una concordancia moderada; por último la PCR 3 con una fuerza de concordancia débil.

4.8 Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Tabla 7. Sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud positiva de los 4 ensayos de PCR en 595 muestras contrastadas con el GE.

	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4
S	45,64 % (IC 39,81 - 51,46)	69,80 % (IC 64,42 - 75,18)	39,26 % (IC 33,55 - 44,97)	22,82 % (IC 17,89 - 27,75)
Esp	95,62 % (IC 93,13 - 98,12)	93,94 % (IC 91,06 - 96,82)	97,31 % (IC 95,30 - 99,32)	99,66 % (IC 98,84-100)
RV+	10,43 (IC 6,04 -18)	11,52 (IC 7,31-18,13)	14,58 (IC 7,25- 29,29)	67,77 (IC 9,47 - 484,89)

S: sensibilidad, Esp: especificidad, RV+: razón de verosimilitud positiva

La **tabla 7** muestra los valores de sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud positiva de los 4 cebadores contrastados con el GE. Puede verse que la PCR 2 dio mejores valores de S seguidos por PCR 1, PCR 3 y PCR 4. La especificidad fue similar en los 4 ensayos.

Resultados

Para una mejor visualización de los resultados obtenidos, se realizaron los cálculos de valores de cribaje en sangre, flujos y orina que se detallan en las **tablas 8, 9 y 10**.

Tabla 8. Sensibilidad, especificidad y Razón de verosimilitud positiva de los 4 cebadores en sangre sobre 244 muestras

	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4
S	33,61 % (IC 24,81 – 42,40)	65,57 % (IC 56,73 – 74,41)	25,41 % (IC 17,27 – 33,54)	19,67 % (IC 12,21 – 27,14)
Esp	98,36 % (IC 95,70 -100)	95,08 % (IC 90,83 – 99,33)	96,72 % (IC 93,15 - 100)	100 % (IC 99,59 - 100)
RV+	20,5 (IC 5,07 – 82,88)	13,33 (IC 6,05 – 29,04)	7,75 (IC 2,82 – 21,29)	0% (IC)

Como muestra la **tabla 8**, la PCR2 fue la que tuvo mejor sensibilidad diagnóstica en muestras de sangre seguido por la PCR1, PCR3 y PCR4.

Tabla 9. Sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud positiva de los 4 cebadores en flujo sobre 250 muestras

	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4
S	49,60% (IC 40,44 - 58,76)	70,40% (IC 62 – 78,24)	52 % (IC 42,84 – 61,16)	28,80% (IC 20,46- 37,14)
Esp	95,20% (IC 91,05 – 99,35)	95,20% (IC 91,05 – 99,35)	99,20% (IC 97,24 - 100)	99,20% (IC 97,24 - 100)
RV+	10,33 (IC 4,64 -23,01)	14,67 (IC 6,66 – 32,28)	65 (IC 9,16 – 461,16)	36 (IC 5,01 – 258,52)

La **tabla 9** muestra que la PCR2 detectó mejor en muestras de flujo seguido por la PCR3, PCR1 y PCR4.

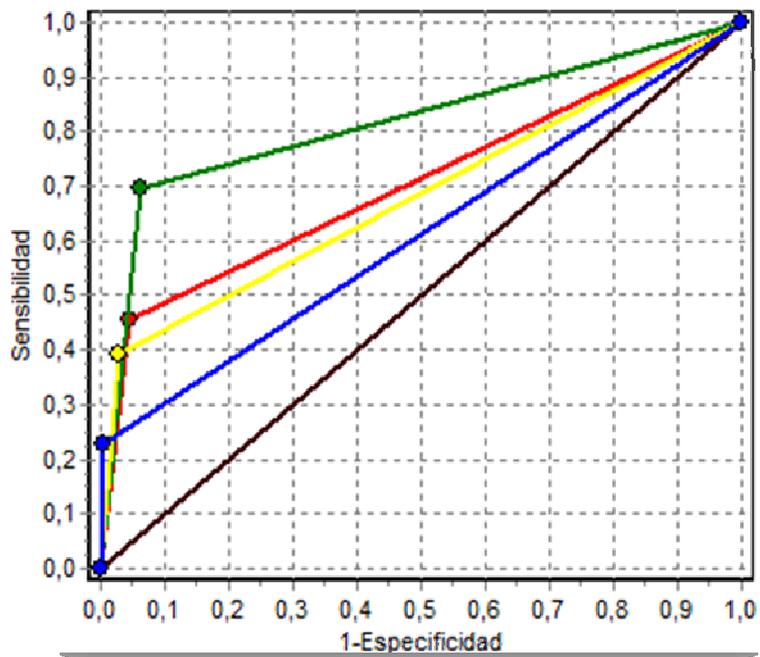
Tabla 10. Sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud positiva de los 4 cebadores en orina sobre 101 muestras

	PCR1	PCR2	PCR3	PCR4
S	64,71 % (IC 50,61 – 78,80)	78,43% (IC 66,16 - 90,70)	41,18 % (IC 26,69 – 55,66)	17,65% (IC 6,20 – 29,09)
Esp	90 % (IC 80,68 – 99,32)	88 % (IC 77,99 – 98,01)	94 % (IC 86,42 - 100)	100% (IC 99-100)
RV+	6,47 (IC 2,75 - 15,23)	6,54 (IC 3,04 -14,04)	6,4 (IC 2,18- 21,57)	0% (IC)

La **tabla 10** muestra que la PCR2 detecto mejor seguido por la PCR1, PCR3 y PCR4.

Los resultados reflejados en las tablas 8, 9 y 10 demuestran que el empleo de la PCR2 (ITS66/ITS279) fue la que mejor sensibilidad obtuvo independientemente de la muestra empleada.

La exactitud diagnóstica de los ensayos de PCR testeados en este trabajo se evaluó realizando una curva ROC para cada una de las pruebas, las cuales se muestran en la **figura 12**. El análisis del ABC al ser el mejor indicador de la exactitud diagnóstica, estas áreas sirvieron para la comparación de las distintas PCR.



CURVA	COLOR	ABC	IC (95 %)
1) PCR 1	Rojo	0,71	0,68 0,74
2) PCR 2	Verde	0,82	0,79 0,85
3) PCR 3	Amarillo	0,68	0,65 0,71
4) PCR 4	Azul	0,61	0,59 0,64

Figura 12. Curvas ROC de las 4 PCR con el ABC y su respectivo IC de las 595 muestras evaluadas. Cada PCR tiene un color detallado en la figura para una mejor visualización de las diferentes ABC.

Se observa que el ABC de la PCR 2 fue mayor respecto a los demás ensayos (0,82 IC 0,79-0,85). También se corresponde con la curva en el gráfico que más se acerca al vértice superior

izquierdo donde se encuentran la mayor cantidad de verdaderos positivos y menor cantidad de falsos positivos.

4.9 Análisis estadísticos de los resultados

Con el objetivo de analizar en cuanto se incrementa la chance de que el individuo este enfermo si la PCR dio positiva, se realizó la determinación de RV+. Los valores hallados de RV+ no arrojaron resultados concluyentes. Por otro lado, debido a que se encontró una diferencia en los IC del ABC de la PCR 2, se realizó un test de ANOVA a mediciones repetidas para analizar entre que ensayos hubo o no diferencias significativas. Los resultados se muestran en la **tabla 10**.

Tabla 11. Resultados del test de ANOVA mostrando valores del área bajo la curva y su valor p

PCR	Área bajo la curva	Valor p
PCR 1 / PCR 2	0,71 vs 0,82	< 0,01
PCR 1 / PCR 3	0,71 vs 0,68	> 0,05
PCR 1 / PCR 4	0,71 vs 0,61	< 0,01
PCR 2 / PCR 3	0,82 vs 0,68	< 0,01
PCR 2 / PCR 4	0,82 vs 0,61	< 0,01
PCR 3 / PCR 4	0,68 vs 0,61	< 0,01

En la **tabla 11** se muestra mediante el test de ANOVA que hay diferencias significativas entre todas las PCR, salvo entre la PCR1 y la PCR3.

DISCUSIÓN

En el año 1996, Carmichael y Shin, publicaron los problemas diagnósticos existentes para obtener un resultado confiable para brucelosis canina y lo llamaron el “*dilema diagnóstico*”. De hecho, recomendaron la utilización de antígenos de referencia probados para las pruebas serológicas y así minimizar la aparición de los falsos positivos que llevan a errores de manejo. Hoy en día, 20 años después, ese inconveniente sigue vigente y la PCR no escapa a ese concepto respecto a su uso en el diagnóstico de la enfermedad.

5.1 Cultivos bacteriológicos

Los aislamientos microbiológicos obtenidos en este trabajo mostraron que, si bien es específico para un diagnóstico inequívoco, la baja sensibilidad es constante con este método además de los riesgos que el mismo conlleva para el operador. La relación entre el tamaño del inóculo y el crecimiento bacteriano ha sido descrito (Zimmerman y col., 1990) y hay autores que sugieren varias muestras de sangre debido a la baja proporción de organismos circulantes en la porción leucocitaria (Hollet, 2006). Esto no fue posible en este estudio debido a la resistencia de los propietarios a dicha práctica; Quizás, esto último podría ser la base para futuros estudios. También es importante tener en cuenta que si bien un hemocultivo positivo confirma la presencia de la enfermedad, uno negativo no la descarta (Wanke MM, 2004, Carmichael y Shin 1996, Green EG y Carmichael LE 2012, Hollet 2006).

5.2 Pruebas serológicas

La prueba serológica de tamiz RSAT mostró niveles de sensibilidad similares a los descritos en otros estudios (Keid y col., 2007a, 2009, Kaufmman y col., 2014). Esta prueba no registró falsos positivos tal como los descritos en la literatura. Una posible razón se deba a que, de la totalidad de los animales positivos al GE definido en la **tabla 2**, todos los reactivos se confirmaron por otras técnicas o por combinación de síntomas y epidemiología compatible con brucelosis canina.

El test de iELISA se realizó sobre 50 sueros de los cuales 34 dieron resultado positivo. A su vez, 5 sueros dieron positivo en ausencia de reacción a las demás pruebas. Esto pudo deberse a que

el iELISA detecta anticuerpos en forma temprana antes que la técnica tamiz de RSAT (Wanke, 2009).

La prueba AGID detectó resultados positivos en animales con historia de curso crónico de la enfermedad. En 11 de los 50 sueros testeados por esta técnica se obtuvieron resultados positivo y negativo al RSAT, lo que coincide con los hallazgos de Keid y col. (2009). En 20 casos positivos hubo coincidencia (RSAT y AGID) y solamente hubo 5 casos RSAT positivo y AGID negativo. Esto pudo deberse a que el antígeno *B. ovis* REO 198 utilizado en Argentina para AGID es completo, es decir, tiene componentes de pared celular y de citoplasma. En otras partes del mundo, existen pruebas de AGID que utilizan antígenos citoplasmáticos o del lipopolisacárido (LPS) lo que difiere respecto a la sensibilidad y especificidad en los resultados obtenidos (Greene y Carmichael, 2012).

5.3 Genes estudiados

En este trabajo se compararon 4 genes: gen codificante para la proteína BCSP31, 16s-23s rRNA (ribosomal del espaciador), IS711 (secuencias de inserción) *omp2a* y *omp2b* (gen codificante para porinas) los cuales se contrastaron con un GE pre establecido. El método de extracción de ADN fue el de columnas de extracción comerciales los que, en teoría, disminuyen los problemas de inhibición de la reacción. De hecho, una buena obtención de ADN es el primer paso en la realización de cualquier PCR diagnóstica para que pueda haber resultados confiables (Yu y Nielsen, 2010) debiéndose utilizar un método robusto y repetible (OIE, 2014).

Los resultados obtenidos en el límite de detección corresponden al empleo como matriz de muestras provenientes de animales sanos. Sin embargo, si bien se han obtenido límites de detección iguales entre la PCR 1 y PCR 4 en sangre por ejemplo (**tabla 5**), al comparar con los resultados de las muestras de sangre de animales enfermos, estos arrojaron una sustancial diferencia (**Tabla 8**). Esto podría explicarse debido a las diferencias que existen entre los ensayos *in vitro*, donde se ha infectado la muestra en forma artificial, respecto a lo que ocurre en las infecciones naturales. En algunos casos, el aislamiento bacteriano desde sangre no concordó con la PCR y viceversa. En el primer caso pudo deberse a que la muestra al tener baja carga bacteriana si se siembran rápidamente en medios de cultivos enriquecidos, se puede obtener el desarrollo de *Brucella* con mucha facilidad. Por otro lado, los componentes de la matriz de la muestra sobre la cual se extrajo el ADN, pudieron

haber interferido en la reacción como por ejemplo inhibidores propios de la muestra (grupo hemo, urea, mucopolisacáridos) degradación del *target* o cantidad del mismo por debajo del límite de detección (Romero y col., 1995a, 1995b). Otra razón, pudo haber sido que con las columnas de extracción ROCHE utilizadas en este estudio, se obtiene ADN de sangre total y no de la capa blanca. De hecho, un estudio reciente obtuvo mejores resultados con medios especiales de extracción a partir de la fracción leucocitaria (Kang y col., 2014).

En los casos que hubo PCR positiva sin detección por las demás combinaciones del GE, podría explicarse si se considera que dichos animales tuvieron contacto con *Brucella* en dosis menores a las requeridas para el desarrollo de la enfermedad (dosis infectante mínima 1×10^4 vía conjuntival y 1×10^6 UFC/mL vía oral (Carmichael y col., 2012). En este caso, no se habría generado la producción de anticuerpos detectables con las pruebas serológicas y mucho menos, los síntomas clínicos compatibles.

5.3.1 Gen codificante para BCSP31

El gen codificante para la proteína BCSP31 ha sido estudiado por muchos autores obteniendo excelentes resultados de sensibilidad y especificidad. Los cebadores utilizados en este trabajo fueron los diseñados por Baily y col., (1992) que, originalmente, fueron testeados en cultivos puros de *Brucella*. Posteriormente, muchos investigadores los evaluaron empleando muestras clínicas de sangre humana y líquidos fetales de animales con muy buenos resultados (Queipo - Ortuño y col., 1997, Navarro y col., 2002, Gallien y col., 1998 Cortez y col., 2001). En este trabajo, los resultados obtenidos mostraron una concordancia moderada respecto al GE (**tabla 6**) y los valores de sensibilidad y especificidad no fueron los obtenidos por dichos autores. Queipo-Ortuño y col. (1997) por ejemplo, obtuvieron una sensibilidad del 100% en 50 muestras de sangre de pacientes humanos que dieron positivo a pruebas serológicas y bacteriológicas. Dentro de las combinaciones posibles para realizar la tabla de 2x2 para obtener valores de cribaje, faltan los individuos que dieron negativo a todas las pruebas es decir, solo se consideraron los individuos reactivos y no lo que estaban sanos, mientras que, en este trabajo, se comparó individuos sanos con enfermos (diseño metodológico de test diagnóstico, Castiglia, 1998). Navarro y col., (1999) cuestionaron los resultados de Morata y col., (1998) dado que no pudieron reproducir los mismos siguiendo las

especificaciones del trabajo publicado. Esto haría pensar en la dificultad de la PCR para reproducir resultados similares (Noordhoek y col., 1993).

BCSP31 ha sido evaluado también como región blanco en la detección de *Brucella* spp. en orina de pacientes humanos (Queipo-ortuño y col., 2006) y, recientemente, en orina de caninos machos con excelentes resultados cuando se lo contrastó con urocultivos y el test de iELISA (Boeri y col., 2016). En el presente estudio, la detección diagnóstica de *Brucella* spp mediante PCR empleando los cebadores B4/B5 en orina fue buena con un 64,71% de sensibilidad (IC 50.61–78.80). Sin embargo, fue algo más baja que la obtenida mediante la PCR 2 (**tabla 10**). Las diferencias de resultados observadas respecto al estudio citado anteriormente, pudieron deberse a que en el presente trabajo se empleó como GE al cultivo bacteriológico sumado a diferentes combinaciones de pruebas (**tabla 2**).

Al momento de escribir este trabajo, no se encontraron reportes de evaluación diagnóstica de estos cebadores en flujos genitales de caninos hembras.

5.3.2 Secuencias de inserción IS711

Nakkas A.F. Al y col., (2002) utilizaron cebadores específicos para la amplificación de IS711 con valores de sensibilidad y especificidad del 100% en muestras clínicas de sangre en humanos. Sin embargo, estos cebadores mostraron baja sensibilidad en la detección de muestras clínicas de caninos. Una de las posibles causas de los resultados obtenidos al emplear la secuencia de inserción IS711 con estos cebadores, pudo deberse a la poca cantidad de copias presentes en *B. canis* comparada con otras especies de *Brucella* como *B. melitensis*, *B. abortus* o *B. ovis*. Además, el ensayo de Nakkas y col., 2002 fue una nested PCR en la que usaron otros cebadores para la segunda ronda los cuales no se utilizaron en este trabajo.

5.3.3 Gen 16s-23s rDNA del espaciador

Respecto al gen 16s-23s rDNA del espaciador, los investigadores brasileiros Keid y col. (2007a) encontraron valores muy altos de sensibilidad y especificidad en muestras de sangre, los cuales no coinciden con los presentados en el presente trabajo. Varias Razones podrían explicar estos resultados:

a) El método de extracción de ADN. Aquí se utilizó un *kit* comercial de ROCHE el cual, en teoría, ayuda a la eliminación de los contaminantes e inhibidores propios de cada muestra. También se obtiene un ADN cristalino libre de impurezas. No obstante, Keid y col., (2007a), realizaron la extracción empleando el método de fenol cloroformo. A su vez, en muestras de sangre obtuvieron una sensibilidad analítica de 1 UFC/mL y en este estudio se obtuvo $1,8 \times 10^3$ UFC/mL.

b) En este trabajo contrastamos la PCR diagnóstica con un GE pre establecido por medio de combinación de técnicas serológicas y el cultivo bacteriano. Sin embargo, Keid y col. (2007a) compararon con RSAT / 2ME-RSAT y hemocultivo pero dividieron las muestras en grupos distintos de animales con y sin aislamiento bacteriano.

c) El antígeno utilizado para la prueba serológica de RSAT utilizado por Keid y col., (2007a, 2007b, 2007c, 2009, 2010) fue diferente al empleado en este trabajo. Aquí se utilizó la cepa *B. canis* M- que reduce la cantidad de resultados falsos positivos en un 50% (Carmichael and Joubert, 1987), mientras que la cepa de *B. ovis* (Badakhsh y col., 1982) utilizada por los investigadores brasileros, no es la recomendada como prueba tamiz para brucelosis canina. Esto haría pensar en una sustancial diferencia en los resultados obtenidos.

Keid y col., (2007b, 2007c) obtuvieron iguales resultados de sensibilidad analítica al emplear tanto muestras de flujos genitales como de sangre. Ese trabajo utilizó como GE la misma PCR combinada con resultados de sangre y/o flujos. A nivel metodológico, no sería correcto el diseño utilizado para estimar valores de sensibilidad/especificidad diagnóstica si es la PCR la que se quiere medir. En el presente estudio, la sensibilidad analítica en flujos dio valores de $1,8 \times 10^2$ UFC/mL. A pesar de no coincidir con los estudios previos, los cebadores diseñados por los investigadores brasileros arrojaron muy buenos valores de sensibilidad y especificidad con sus respectivos IC.

5.3.4 Genes *omp2a* y *omp2b*

Leal-Klevezas y col., (1995) desarrollaron una PCR diagnóstica amplificando la región *omp2b* de *B. abortus* con muy buenos resultados utilizando para ello los cebadores JPF/JPR. El ensayo de los autores mexicanos hace hincapié en el método de extracción de ADN como una limitante del proceso. En efecto, sin una buena muestra y un protocolo de extracción de ADN que asegure la ausencia de inhibidores, no es posible obtener resultados confiables. Los autores dicen también textualmente: “*La Sensibilidad de la prueba con bacterias diluidas en sangre no se intentó*

debido que Brucella es un parásito intracelular dentro de los leucocitos, por lo tanto, cualquier resultado de este tipo de experimentos no podría ser de valor práctico". En nuestro trabajo la sensibilidad analítica se realizó de ese modo ya que se siguieron las recomendaciones descritas por la OIE (OIE, 2016). Otro detalle que llama la atención es que las muestras de sangre las procesaron con citrato de sodio o heparina. Se sabe que esta última inhibe la reacción de PCR lo cual resulta muy discordante con los resultados del presente estudio en el cual se usó citrato de sodio y columnas de extracción de ADN. En nuestro trabajo se utilizaron los cebadores el JPF *forward* y el JPR *ca reverse*, este último fue desarrollado por Imaoka y col., (2007) para amplificar solo regiones de *B. canis* y *B. suis*. El límite de detección de este ensayo de PCR fue bajo comparada con la PCR 2 y la PCR 1. Los valores de sensibilidad y especificidad estuvieron en tercer lugar después de la PCR 2 y PCR 1 lo que haría poner en duda su utilidad para muestras clínicas. A pesar de ello, muy buenos resultados han sido obtenidos al emplear los cebadores JPF/JPR *ca* en muestras de cultivos puros (Ghodasara y col., 2010, Imaoka y col., 2007).

5.4 Índice de concordancia

El índice de concordancia evalúa la reproducibilidad de la nueva prueba diagnóstica comparada con el GE. Distintos autores han recomendado presentar este índice (kappa) con los datos de muestreo ya que el mismo, puede ser afectado por la prevalencia de la enfermedad y no ser adecuado por sí solo para generalizar resultados (Thompson y Walters 1998, De Vet, 1998). En el presente trabajo se siguieron las recomendaciones planteadas por dichos autores y el índice kappa obtenido presentó una fuerza de concordancia buena. En conjunto con los demás resultados, éste índice contribuyó en la solidez de los mismos (**tabla 6**).

5.5 Razón de Verosimilitud Positiva

Este indicador muestra en cuanto se incrementa la chance de que el individuo este enfermo si la PCR dio positiva y tiene la ventaja de no estar influenciado por la prevalencia de la enfermedad. Valores mayores o igual a 10 muestran una fuerte probabilidad de tener la enfermedad si la prueba (PCR) da positiva (Johnson, 2004, Gardner y Greiner, 2006). Las tablas 7, 8, 9 y 10 permiten ver que todos los ensayos dieron resultados de RV+ entre 6 y 20. A su vez, los IC se solapan en los 4 ensayos independientemente de la muestra analizada con valores muy alejados

entre sí. La $RV+$ es un cociente y, al mostrar el solapamiento entre los 4 ensayos, este indicador no sirvió por sí solo para mostrar la utilidad de las pruebas de PCR. Por esta razón, se recurrió al análisis del ABC de las curvas ROC explicado en el punto 5.6.

5.6 Curvas ROC

La exactitud diagnóstica puede medirse por medio del análisis del ABC de las curvas ROC, las cuales son la representación gráfica de la $RV+$. La curva ROC nos da una idea visual del rendimiento global de un test. Basado en un criterio arbitrario, Sweet y col., (1988), sugirieron los siguientes valores asignándoles categorías: 0,5 a 0,7 bajo, 0,7 a 0,9 moderado y 0,9 a 1 alto.

Como se puede ver en la **figura 12**, las 4 ABC permitieron evaluar cuál de los ensayos de PCR fue el mejor en el presente estudio, luego de la utilización del test estadístico ANOVA a mediciones repetidas. El análisis del ABC obtenido para los distintos ensayos no permitió una clasificación diferencial según las categorías antes descritas. Sin embargo, mediante las curvas ROC se pudo determinar gráficamente una mejor performance de uno de los ensayos.

5.5 Consideraciones finales

Desde sus comienzos, la PCR ha ido incorporando diferentes técnicas para detección de ADN con fines diagnóstico en muchas enfermedades infecciosas. Los resultados varían de acuerdo a cada grupo de investigación y tecnología utilizada. Es fundamental conocer bien la enfermedad para saber que muestra clínica podrá ser de mejor utilidad para encontrar el ADN del microorganismo en cuestión. Siempre se debe tener presente que lo que se puede decir es hay o no hay ADN del microorganismo, del hospedero o de ambos en la muestra pero no se puede inferir pronóstico ni estado del individuo enfermo con un resultado. Tampoco se puede decir si la bacteria se encuentra viable o no, si se está eliminando o son solo fragmentos de ADN. Finalmente, se podría decir que la PCR es un complemento diagnóstico y quizás, en un futuro, pueda reemplazar otras técnicas de uso actual.

CONCLUSIONES

Conclusiones

6.1 La discusión de los resultados obtenidos según los objetivos planteados en este trabajo, permitió arribar a las siguientes conclusiones:

- ✓ El empleo de los cebadores ITSS66/ITSS279 (PCR 2) mostró una mejor sensibilidad en la detección de *Brucella* spp. en muestras clínicas de caninos seguido luego por B4/B5 (PCR 1), JPF/JPR ca (PCR 3) y O1/O2 (PCR 4) respectivamente. La especificidad fue alta en los 4 ensayos y la RV+ no arrojó resultados concluyentes.
- ✓ Los cebadores ITSS66/ITSS279 (PCR2) tuvieron mejor sensibilidad analítica en muestras clínicas de sangre, flujo y orina de caninos.
- ✓ Los cebadores ITSS66/ITSS279 (PCR 2) mostraron una buena concordancia con el GE respecto de los otros tres ensayos, por lo tanto la PCR 2 es tan útil como el GE establecido y se recomienda realizarla junto al GE.
- ✓ Los cebadores ITSS66/ITSS279 (PCR 2) tuvieron una mejor exactitud diagnóstica respecto a los demás cebadores empleados, representados por una mayor área bajo la curva ROC.
- ✓ El análisis de los intervalos de confianza mediante curvas ROC sumado a las diferencias significativas de los cebadores ITS66/ITS279 (PCR 2) respecto a las demás pruebas de PCR ($p < 0,01$), determinaron su mayor utilidad en la detección de *Brucella* spp. en las muestras clínicas de caninos evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

A

1. **Al-Ajlan HH., Ibrahim AS., Al-Salamah AA.,** 2010. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *Pol J Microbiol.* 60 : 27-33.
2. **Altman DG.** 1991. Practical statistics for medical research. Chapman and Hall New York.
3. **Alton GG., Jones LM., Angus RD., Verger JM.,** 1988. Techniques for the brucellosis Laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
4. **Ariza Cardenal J.,** 1995. Brucelosis. En: Farreras-Rozman, Medicina Interna. 13ra Edición Barcelona: Mosby-Doyma libros S.A.; p.2312-7.
5. **Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC.,** 2009. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics.* 4; 10:352.
6. **Angus RD., Barton CE.,** 1983. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. 3rd. International Symposium on Brucellosis, Algiers, Argelia. *Dev Biol Stand.* 56: 349-56.
7. **Anderson TD., Cheville NF.,** 1986. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am J Pathol.* 124: 226-37.
8. **Anderson TD., Meador VP., Cheville NF.,** 1986. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet Pathol.* 23: 227-39.

B

9. **Baddour MM., Alkhalifa DH.,** 2008 Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol.* 54: 352-7
10. **Badakhsh FF., Carmichael LE., Douglass JA.,** 1982. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. *Clinical Microbiology,* 15: 286–289.
11. **Baily GG., Krahn BJ., Drasar BS., Stoker N.G.,** 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95: 271-275.

12. **Biodynamics S.R.L.** Disponible en: www.biodynamics.com.ar/minibetaactina.pdf
13. **Blasco J., C Gamazo.,** 1994. Brucelosis animal. *Investigación y ciencia* 218, 56-62.
14. **Boeri E., Escobar G., Ayala SM., Sosa-Estani S., Lucero N.,** 2008. Brucelosis canina en caninos de la ciudad de Buenos Aires *Medicina (B Aires)* 68: 291-297
15. **Boeri EJ, Lopez G, Guido GG, Ciocca M, Elena SC and Wanke MM.,** 2016
Usefulness of Urine as a Sample for Detection of *Brucella* Spp in Male Canines. *J Vet Sci Med Diagn* 5:4. 1-6
16. **Bossi P., Tegnell A., Baka A., Van Loock F., Hendriks J., Werner A., Maidhof H., Gouvras G.,** 2004. Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. *Euro Surveill* 9: E15-16
17. **Bricker, BJ., Halling, SM.,** 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2660–2666.
18. **Bricker, BJ., Halling SM.,** 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1640–1642.

C

19. **Capasso L.** 2002. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect* 45:122-127.
20. **Carmichael LE.,** 1990. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR (eds.) *Animal Brucellosis*. Boca Raton, Fl: CRC Press, p 335-50
21. **Carmichael LL., 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.
22. **Carmichael LE., Joubert JC.,** 1988. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet* 78: 63-73
23. **Carmichael LE., Shin SJ.,** 1996. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*. 11: 161-5.
24. **Castro HA., González SR., Prat MI.,** 2005. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 39:203-16

25. **Celli J., de Chastellier C., Franchini DM., Pizarro-Cerda J., Moreno E., Gorvel JP.,** 2003. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med.* 198: 545-56.
26. **Cherwonogrodzky JW., Dubray G., Moreno E., and Mayer H.,** 1990. Antigens of *Brucella*, En. K. Nielsen and J. R. Duncan (ed.). Animal brucellosis. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. Pp. 19-64.
27. **Corbel MJ., Morgan WJB.,** 1984. Genus Brucella Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: Holt JG, editos. Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1. Baltimore (MD): Williams and Wilkins, 377-88.
28. **Corbel MJ.,** 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis.*3: 213-21.
29. **Cortez, A., Scarcelli, E., Soares, R.M., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Genovez, M.E., Ferreira, F., Richtzenhain, L.J.,** 2001. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 79:500–501.

D

30. **De Vet H.** 1998. Observer reliability and agreement. En: Armitage P, Colton T, editores. Encyclopedia of Biostatistics Vol. 4. Chichester: John Wiley & Sons; 3123-7.
31. **Delgado M.G., Armoriaga C., Miranda N.,** 2008. Diagnóstico serológico de brucelosis canina en la ciudad de San Luis. XVII Reunión científica-técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. E-17.

F

32. **Ficht TA., Bearden SW., Sowa BA., Adams LG.,** 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 57: 3281–3291.
33. **Forbes LB.,** 1990. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 196: 911-6
34. **Freer E., Rojas N., Weintraub A., Lindberg A., Moreno E.,** 1995. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol.*146:569-578.
35. **Freer E., Moreno.E., Moriyón.I., Pizarro-Cerda J., Weintraub. A., Gorvel. J-P.,** 1996 *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to

hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol.* 178:5867-5876.

36. **Fugier E., Pappas G., Gorvel JP.,** 2007. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert Rev Mol Med.* 9: 1-10.

G

37. **Gardner IA., Greiner M.,** 2006. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Vet Clin Pathol.* 35: 8-17.
38. **Garshasbi M., Ramazani A., Sorouri R., Javani S., Moradi S.,** 2014. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanzan, Iran. *Braz J Microbiol.* 45: 533-8.
39. **Ghodasara S., Ashish R., Rank DN., Bhanderi BR.,** 2010. Identification of *Brucella* spp from animals with reproductive disorders by polymerase chain reaction assay. *Bufallo bulletin .vol 29 N°2*
40. **Green CE., Carmichael LE.,** 2012. Infectious diseases of the Dogs and Cat. WB Saunders, Philadelphia, 399-411.
41. **Gallien, P., Dorn, C., Alban, G., Staak, C., and Protz, D.,** 1998. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* 142: 512–514.
42. **Gorvel JP., Moreno E.,** 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 90: 281-297.

H

43. **Hartigan P.,** 1997. Human brucellosis: epidemiology and clinical manifestations. *Irish Vet J .50:* 179-80.
44. **Halling SM., Tatum FM., Bricker BJ.,** 1993. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene.*133: 123-7.
45. **Hinić V., Brodard I., Petridou E., Filioussis G., Contos V., Frey J., Abril C.,** 2010. Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1. *Vet Microbiol.* 141: 391-2.

46. **Hollet RB.**, 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*. 66: 575-7.
47. **Hughes ML.**, 1897. Mediterranean, Malta or undulant fever. London: Macmillan

I

48. **Iachini, R.H., Boeri, E.J., Castro, J., Gramajo, F.O.**, 2004. Prevalencia serológica de brucelosis canina en diferentes barrios de la ciudad de Buenos Aires. Comunicación libre A4, Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires
49. **Imaoka K., Kimura M., Suzuki M., Kamiyama T., Yamada A.**, 2007-Simultaneous Detection of the Genus Brucella by Combinational PCR *Jon. J. Infect Dis.* 60: 137-139

J

50. **Johnson NP.**, 2004. Advantages to transforming the receiver operating characteristic (ROC) curve into likelihood ratio co-ordinates. *Stat Med.* 23: 2257-66.

K

51. **Kang SI., Lee SE., Kim JY., Lee K., Kim JW., Lee HK., Sung SR., Heo YR., Jung SC., Her M.**, 2014. A new Brucella canis species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 37: 237-41
52. **Kauffman LK., Bjork JK., Gallup JM., Boggiatto PM., Bellaire BH., Petersen CA.**, 2014. Early detection of Brucella canis via quantitative polymerase chain reaction analysis. *Zoonoses Public Health* 61: 48-54.
53. **Keid LB., Soares RM., Vieira NR., Megid J., Salgado VR .**, 2007. Diagnosis of Canine Brucellosis: Comparison between Serological and Microbiological Tests and a PCR Based on Primers to 16S-23S rDNA Interspacer. *Vet Res Commun.* 31: 951-965
54. **Keid LB., Soares RM, Vasconcellos SA., Chiebao DP.**, 2007. A polymerase chain reaction for detection of Brucella canis in vaginal swabs of naturally infected bitches, *Theriogenology.* 2007; 68: 12060-1270

55. **Keid LB., Soares RM., Vasconcellos SA., Chiebao DP., Megid J., Salgado VR., Richtzenhain LJ.,** 2007. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology*. 67: 1203-10.
56. **Keid LB., Soares R., Vasconcellos S., Megid J., Salgado V., Richtzenhain L.,** 2009. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res Vet Sci* 86 : 22–26
57. **Keid LB, Soares RM., Vasconcellos SA, Salgado VR., Megid J., Richtzenhain LJ.,** 2010. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. *Vet Rec* .2010. 167: 96-99

L

58. **Lapaque N., Moriyon I., Moreno E., Gorvel JP.,** 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol*. 8: 60-6.
59. **Leal-Klevezas DS., Martinez-Vazquez IO., Lopez-Merino A., Martinez soriano JP.,** 1995. Single –Step PCR for detection of *Brucella* spp. from Blood and milk of infected animals. *J.Clin Microbiol*. 33: 3087-3090
60. **Lopez G., Ayala SM., Efron AM., Gomez CF., Lucero NE.,** 2009. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province *Rev.Argent.Microbiol*. 41: 97-101
61. **García-Yoldi D., Marín CM., de Miguel MJ., Muñoz PM., Blasco JM., Jacques I., Grayon M., Cloeckart A., Ferreira AC., Cardoso R., Corrêa de Sá MI., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B.,** 2008 Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Clin Microbiol*. 46: 3484-7.
62. **Lopez-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C., de Miguel M., Barquero-Calvo E. , Guzman-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B.,** 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology*. 154: 152–155
63. **Lucero, N.E.** 1996. *Brucella*. Microbiología biomédica Eds. J.A. Basualdo, C.E. Coto, R.A de Torres, ATLANTE, Buenos Aires.

64. **Lucero NE., Escobar GI., Ayala SM., Lopez G.,** 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzymelinked immunoassay for diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs.- *J Med Microbiol.* 51: 656-60
65. **Lucero, N.E., Escobar GI., Ayala SM., Jacob N.,** 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Journal of Medical Microbiology.* 54: 457-461.
66. **Lucero N., Corazza R., Almuzara MR., Reynes E., Escobar G., Boeri E., Ayala S.** 2010. Human Brucellosis canis outbreak linked to infection in dogs *Epidemiolog. Infect.* 138: 280-5
67. **Lucero NE., Escobar GI., Ayala SM., Maldonado P., Kaufman S., Escobar G., Boeri E., Jacob Néstor.** 2010. *Brucella canis* causing infection in an HIV – infected patient. *J Vector Borne Zoonotic Dis.* 10: 527-9.

M

68. **Mayfield JE., Bricker BJ., Godfrey H., Crosby RM., Knight DJ., Halling, SM., Balinsky D., Tabatabai, L.B.,** 1988. The cloning and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene.* 63: 1–9.
69. **Michaux-Charachon S., Bourg G., Jumas-Bilak E., Guigue-Talet P., Allardet-Servent A., 'Callaghan D.,** 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella.* *J Bacteriol.* 179: 3244-9.
70. **Mitka S., Anetakis C., Souliou E., Diza E., Kansouzidou A.,** 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1211. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods.
71. **Morata P., Queipo-Ortun˜o MI., Colmenero JD.,** 1998. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2443–2446.
72. **Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., Mayer, H.,** 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol.* 172:3569-76.

N

73. **Nakkas AF.AI., Wright SG., Mustafa AS., Wilson S.,** 2002 Single-Tube. Nested PCR for detection the diagnosis of human brucellosis in Kuwait. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 397-403
74. **Navarro E., Fernandez JA., Escribano J., Solera J.,** 1999 PCR Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol.* 37: 1654–1655.
75. **Navarro E., Escribano J., Fernández J., Solera J.,** 2002. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 34: 147-51.
76. **Noordhoek, G., van Embden JD., Kolk AH.,** 1993. Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *New Engl. J. Med.* 329: 2036.

O

77. **OIE.,** 2009. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. In Bovine Brucellosis. Office Internatiolal des epizootics, Paris. Chapter 2.4.3
78. **OIE.,** 2014 Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). Paris: Office International des Epizooties, fifth ed. (Chapter 2.7.9); p 1-14.
79. **OIE,** 2014. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres en: desarrollo y optimización de las pruebas de detección de ácidos nucleícos. Capítulo 3.6.3
80. **OIE.,** 2016. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. In: Bovine Brucellosis, Office International des epizootics, Paris, Chapter 2.1.4
81. **Osterman, B., and Moriyón, I.,** 2006. International Committe on Systematics of Prokaryotes, Subcommitte on the Taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1173-1175.
82. **Ouahrani S., Michaux S., Sri Widada J., Bourg G., Tournebize R., Ramuz M., Liautard JP.,** 1993. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion

sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol.* 139: 3265-73

P

83. **Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., and Fraser, C.M.** 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13148-13153.
84. **Pizarro-Cerdá J., Méresse S., Parton RG., van der Goot G., Sola-Landa A., Lopez-Goñi I., Moreno E., Gorvel JP.,** 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun.* 66: 5711-24.

Q

85. **Queipo-Ortuño MI., Morata P., Ocón P., Manchado PO., Colmenero JD.,** 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2927–2930
86. **Queipo-Ortuño MI., Colmenero JD., Muñoz N., Baeza G., Clavijo E., Morata P.,** 2006. Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by real-time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J Urol.* 176: 2290-2293.
87. **Queipo-Ortuño MI., Tena F., Colmenero JD., Morata P.,** 2007. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of *Brucella* DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27: 109-14.

R

88. **Rijpens NP., Jannes G., Van Asbroeck M., Rossau R., Herman LM.,** 1996. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol.* 62: 1683- 1688
89. **Romero C., Gamazo C., Pardo M., Lopez Goñi I.,** 1995 Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* , 33: 615-617
90. **Romero C., Pardo M., Grillo MJ., Diaz R., Blasco M., Lopez Goñi I.,** 1995. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. *J Clin Microbiol.* 33: 3198–3200.
91. **Roop RM 2nd, Gaines J M., Anderson ES., Caswell CC., Martin, DW.,** 2009. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med. Microbiol. Immunol.* 198: 221-238.
92. **Ramamoorthy S., Woldemeskel M., Ligett A., Snider R., Cobb R., Rajeev S.,** 2011. *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA *Emerg Infect Dis.* 17: 2386-7

S

93. **Setubal,J.C., Bowns,C., Boyle,S., Crasta,O.R., Czar,M.J., Dharmanolla,C., Gillespie,J.J., Kenyon,R.W., Lu,J., Mane,S., Mohapatra,S., Nagrani,S., Purkayastha,A., Rajasimha,H.K., Shallom,J.M., Shallom,S., Shukla,M., Snyder,E.E., Sobral,B.W., Wattam,A.R., Will,R., Williams,K., Yoo,H., Bruce,D., Detter,C.,Munk,C. and Brettin,T.S.,** 2007.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/161617991?report=genbank>
94. **Serikawa T., Muraguchi T., Nihon Juigaku Zasshi.,** 1979. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. *Jap. J. Vet. Sci.* 41: 607-616.
95. **Serpe L., Gallo P., Fidanza N., Scaramuzzo A., Fenizia D.,** 1999. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J.Dairy Res.* 66: 313–317.
96. **Scholz HC., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl JA, Zygmunt MS., Cloeckert A., Koylass M., Whatmore AM., Blom J., Vergnaud G., Witte**

- A., **Aistleitner K., Hofer E.**, 2016. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 66: 2090-8.
97. **Starr T., Ng TW., Wehrly TD., Knodler LA., Celli J.** 2008. Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic.* 9: 678-94.
98. **Sung-Il Kang., Moon H., Jong Wan Kim., Ji-Yeon Kim., Kyung Yuk Ko., Yun-Mi Ha, Suk Chan Jung.,** 2011. Advanced Multiplex PCR Assay for Differentiation of Brucella Species. *Appl Environ Microbiol.* 77: 6726–6728.
99. **Swets JA.** 1988 Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science.* 240:1285–1293.

T

100. **Thompson WD, Walters SD.** 1998. A reappraisal of the kappa coefficient. *J Clin Epidemiol.*; 41:949-58.
101. **Tomas Ficht.,** 2010. Brucella taxonomy and evolution *Future Microbiol* 5: 859-866.
102. **Tomaso H., Kattar M., Eickhoff M., Wernery U., Al Dahouk S., Straube E., Neubauer H., Scholz HC.,** 2010. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. *BMC Infect Dis.* 20; 10:100.

V

103. **Vicente C. Castiglia.,** 1998. Principios de investigación biomédica. 2ª edición. Buenos Aires. Editorial Sudamérica pág. 111-131
104. **Von Bargen K., Gorvel J-P., Salcedo SP.,** 2012. Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev.* 36:533-62.

W

105. **Wallach JC., Giambartolomei G.H., Baldi P., Fossati CA.,** 2004. Human Infection with M- Strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis.* 10: 146–148.
106. **Wanke MM.** 2004. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci.* 82-83: 195-07.
107. **Wanke María Magdalena.,** 2009. Diagnóstico y seguimiento de la brucelosis canina mediante métodos serológicos basados en antígenos proteicos de *Brucella* spp. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) Cátedra de Inmunología Argentina, 148 h
108. **Whatmore A. M., Davison N., Cloeckert A., Al Dahouk S., Zygmunt M. S., Brew S. D., Perret L.L., Koylass M. S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H. C., Dick E. J. Jr., Hubbard G., Schlabritz-Loutsevitch N. E.,** 2014. *Brucella papionis* sp. Nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 (Pt 12): 4120-8.
109. **Wilfert CM.,** 1986. *Brucella*. En: Zinsser, Microbiología. Joklik WK, Willet HP, Amos AB. 18 Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; p. 764-71.
110. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2005. WHO Laboratory Biosafety Manual, Second Edition. WHO, Geneva, Switzerland.

X

111. **Xiang Z., Zheng W., He, Y.,** 2006. BBP: *Brucella* genome annotation with literature mining and curation. *BMC Bioinformatics.* 7: 347.
112. **Xavier M., Pixao T., den Hartigh A., Tsolis R., Santos R.,** 2010. Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J.* 4: 109-118. .

Y

113. **Yu WL., Nielsen K.** 2010. Review of Detection of *Brucella* sp. by Polymerase Chain Reaction. *Croat Med J.* 51: 306–313.

Z

Bibliografia

114. **Zimmerman SJ., Gillikin S., Sofat N., Bartholomew WR., Amsterdam D.,** 1990. Case report and selected blood culture study of Brucella bacteremia. *J Clin Microbiol.* 28: 2139–2141.
115. **Zerva L., Bourantas K., Mitka S., Kansouzidou A., Legakis NJ.,** 2001. Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol.* 39: 1661–1664.