

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
DE BRUCELOSIS EN BÚFALOS Y BOVINOS
DEL NORDESTE ARGENTINO**

Diana Elina Martinez

Tesis presentada a la Carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias como requisito para
acceder al grado de

**DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Facultad de Ciencias Veterinarias
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**

Corrientes, Septiembre de 2012

**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
DE BRUCELOSIS EN BÚFALOS Y BOVINOS
DEL NORDESTE ARGENTINO**

Diana Elina Martinez

Jurado de Tesis:

Dra. María Elena Cicutá

Dra. María Graciela Draghi de Benítez

Dr. Luis Antonio Merino

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las personas que han contribuido con sus esfuerzos a generar conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

¡Tanto debo agradecer!

A Dios por permitirme ser quien soy y a la Vida, por ser a la vez derecho inalienable y regalo permanente, gracias.

A mi familia, seno de mi desarrollo, donde aprendí el valor del esfuerzo y el gusto por el trabajo. Por haberme apoyado y acompañado en todo momento, gracias.

A los afectos y amores que encontré en el camino, porque son indispensables para mí y porque siempre fueron aliciente, gracias.

A Roberto Jacobo y Susana Torioni de Echaide porque me guiaron, enseñaron y fortalecieron. Por su grandeza, humildad, generosidad, inteligencia e inmensa calidad humana, gracias.

A Ana Russo, Graciela Draghi y Ana Nicola por su entusiasmo y apoyo, gracias.

A Nerina, Carolina, Eugenia y Paola del laboratorio de Inmunología de la EEA INTA Rafaela, por toda la colaboración y la compañía, gracias.

A todas las personas que han participado en la realización de este proyecto, productores y colegas que participan en las diversas áreas como asesores de establecimientos, a los ayudantes alumnos, a los técnicos de de frigoríficos, de organismos sanitarios, de laboratorio. Por su inconmensurable y desinteresada ayuda, gracias.

A los hombres y mujeres que conocí en este camino. A los hombres, porque tuvieron la capacidad de darme un lugar para trabajar y aprender sin atender a cuestiones de género. A las mujeres, porque no dudaron un instante en realizar sus sueños y llegar a la excelencia. Por ser un incomparable ejemplo, gracias.

ABREVIATURAS

FC: Fijación de Complemento
BPA: Antígeno bufferado en placa
SAT: Seroaglutinación en tubo
2ME: Dosmercapto-etanol
FPA: Polarización Fluorescente
ELISA-c: Enzimoimmunoensayo competitivo
ELISA-i: Enzimoimmunoensayo indirecto
POS: positivos
NEG: negativos
Ag: antígeno
AC: anticuerpo
IgM: inmunoglobulina M
IgG: inmunoglobulina G
UIFC: Unidades Internacionales Fijadoras de Complemento
UmP: Unidades milipolares
PP: porcentaje de positividad
%I: porcentaje de inhibición
M23: monoclonal 23
ROC: Receiver operator characteristic
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
dNTP: desoxirribonucleótidos tri-fosfato

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa zoonótica que causa pérdidas en la producción ganadera y en la salud humana. En Argentina está vigente un Plan Nacional de Control y Erradicación de la brucelosis que incluye la vacunación de bovinos y búfalos con cepa 19 de *Brucella abortus*, el diagnóstico serológico y la segregación de los positivos.

Los rodeos bubalinos más importantes de Argentina se encuentran concentrados en las provincias de Formosa y Corrientes y generalmente conviven con rodeos bovinos dentro de los establecimientos; ambas especies son susceptibles de infectarse con *Brucella spp.*

El objetivo del trabajo fue realizar un estudio epidemiológico de brucelosis en bovinos y bubalinos que comparten el hábitat.

En este estudio se analizaron diferentes técnicas serológicas reglamentadas por el SENASA comparándolas con FC. BPA resultó una prueba eficaz para el diagnóstico de brucelosis en búfalos, mientras que SAT/2ME no son adecuadas en las condiciones usadas para bovinos y requieren de una estandarización. Se validaron las pruebas de nueva generación (SENASA/OIE). Se determinó el punto de corte, sensibilidad (*Se*), especificidad (*Es*) y concordancia (*k*) para FPA (*Se*: 84,3%, *Es*: 94,9%, *k*: 0,719), ELISA-c (*Se*: 85,0%, *Es*: 97,3%, *k*: 0,821), ELISA-i M23 (*Se*: 57,9%, *Es*: 87,7%, *k*: 0,392) y ELISA-i A/G (*Se*: 94,4%, *Es*: 96,3%, *k*: 0,843), concluyéndose que ELISA-c y ELISA-i A/G fueron las de mejor desempeño.

Se realizó una encuesta epidemiológica de rodeos bovinos y bubalinos en Formosa y Corrientes a partir de datos de laboratorios de red SENASA, entre los años 2008 y 2011. Se evidenció una mayor proporción de positivos en búfalos (3,8%) que en bovinos (0,6%), y en Formosa (0,5%) que en Corrientes (0,2 %). Se realizó un estudio serológico transversal en rodeos bubalinos de ambas provincias y los resultados fueron congruentes con los de la encuesta.

Mediante epidemiología molecular en rodeos bovinos y bubalinos se estableció la presencia de cepas vacunales y silvestres en Formosa, mientras que en Corrientes sólo se encontró la cepa vacunal de *B. abortus*. Entre las cepas silvestres se identificaron, mediante el análisis de las secuencias de ADN amplificadas, *B. abortus* bv1 y por primera vez en Argentina bv 5 en bovinos y búfalos. Este hallazgo fue corroborado por la tipificación bioquímica y molecular de una cepa de *B. abortus* aislada a partir de un feto bubalino proveniente de Formosa.

Palabras clave: *Brucella*, *Bubalus*, serología, diagnóstico molecular, tipificación.

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease causing losses in livestock production and human health issues. In Argentina, bovines and buffaloes are involved in the Official Programme to Control and Eradicate brucellosis, based on vaccination, serological test and slaughter. The aim of this work was to carry out an epidemiological study of brucellosis in bovines and buffaloes that cohabit in the NE of Argentina. The survey and the cross-sectional study were based on serological tests and molecular analysis. BPA was satisfactory as screening test of brucellosis in buffalo. ELISA-c, ELISA-i A/G and FPA showed a high performance as confirmatory tests in this specie, while SAT/2ME and ELISA-i M23 were useless. The survey revealed that brucellosis is more widespread in Formosa than in Corrientes provinces and it is more prevalent in buffaloes than in bovines. The cross-sectional study was consistent with these results. Molecular analysis unveiled the presence of *B. abortus* bv1, bv5 and the vaccine strain S19 in bovines and buffaloes from Formosa while only S19 was identified in those from Corrientes. Typification of a *Brucella* strain isolated from an aborted buffalo's fetus, allowed us confirm the presence of *B. abortus* bv5 for the first time in buffalo and in America.

Keywords: *Brucella*, *Bubalus*, serology, molecular diagnostics, typification.

1.4.3.4.	Epidemiología	21
1.4.3.5.	Transmisión entre especies	21
1.4.3.6.	Patogenia	22
1.4.3.7.	Respuesta inmune	23
1.4.3.7.1.	Respuesta humoral	23
1.4.3.7.2.	Respuesta celular	23
1.4.3.8.	Control	24
1.4.4.	Del diagnóstico	24
1.4.4.1.	Cultivo	24
1.4.4.2.	Diagnóstico molecular	25
1.4.4.3.	Serología	27
1.4.4.3.1.	Interferencia vacunal	29
1.4.4.3.2.	Serología en búfalos	30
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA		31
2.1.	Pruebas serológicas	31
2.1.1.	Convencionales	31
2.1.1.1.	Fijación de Complemento	31
2.1.1.2.	Técnica del Antígeno Bufferado en Placa (BPA)	31
2.1.1.3.	Seroaglutinación en Tubo o Prueba de Wright (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2ME)	32
2.1.2.	De nueva generación	32
2.1.2.1.	Seros de referencia	32
2.1.1.1.	Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA)	33
2.1.1.2.	Enzimoinmunoensayo de Competición (ELISA-c)	33
2.1.1.3.	Enzimoinmunoensayo Indirecto (ELISA-i)	34
2.2.	Técnicas moleculares	35
2.2.1.	Extracción de ADN	35
2.2.2.	Secuencias de ADN objetivo	35
2.2.2.1.	Gen <i>omp31</i>	35
2.2.2.2.	Gen <i>omp2ab</i>	36
2.2.2.3.	Gen <i>eri</i>	36
2.2.2.4.	Gen <i>alkB</i> -Inserto <i>IS711</i>	37
2.2.3.	PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	39

2.2.4.	RT-PCR (PCR en tiempo real)	40
2.2.5.	Clonación	41
2.2.6.	Secuenciación	41
2.3.	Cultivo bacteriológico	42
2.4.	Identificación y tipificación	42
2.5.	Cepas de <i>Brucella</i>	44
2.6.	Técnicas serológicas en búfalos	44
2.6.4.	Evaluación de las técnicas convencionales en búfalos	44
2.6.5.	Validación de las pruebas serológicas de nueva generación en búfalos	44
2.6.5.1.	Análisis estadístico	45
2.7.	Estudios epidemiológicos	46
2.7.1.	Ecosistemas	46
2.7.2.	Tipos de explotación ganadera	47
2.7.3.	Epidemiología comparativa en bovinos y bubalinos	47
2.7.3.1.	Epidemiología basada en estudios serológicos	47
2.7.3.1.1.	Encuesta serológica a partir de datos de Laboratorios de RED SENASA	47
2.7.3.1.2.	Estudio serológico transversal en rodeos bubalinos	48
2.7.3.1.2.1.	Diseño experimental	48
2.7.3.1.2.1.1.	Rodeos bubalinos	48
2.7.3.1.2.1.2.	Muestras	49
2.7.3.1.2.1.3.	Análisis de datos	49
2.7.3.2.	Epidemiología basada en estudios moleculares	49
2.7.3.2.1.	Diseño experimental	49
2.7.3.2.1.1.	Rodeos bubalinos y bovinos	49
2.7.3.2.1.2.	Muestras	50
2.7.3.2.1.3.	Análisis	50
2.7.3.3.	Caracterización molecular de las cepas de <i>Brucella</i>	51
CAPÍTULO III: RESULTADOS		52
3.1.	Pruebas serológicas en búfalos	52
3.1.1.	Fijación de Complemento como técnica de referencia	52

3.1.2. Evaluación de las técnicas serológicas clásicas: BPA - SAT/2ME	52
3.1.3. Validación de las pruebas serológicas de nueva generación: FPA, ELISA-c, ELISA-i M23 y ELISA-i A/G	54
3.2. Epidemiología comparativa de brucelosis en rodeos bovinos y bubalinos	62
3.2.1. Epidemiología basada en estudios serológicos	62
3.2.1.1. Encuesta epidemiológica	62
3.2.1.2. Estudio transversal en rodeos bubalinos	70
3.2.2. Epidemiología basada en estudios moleculares	72
3.2.2.1. Caracterización molecular de <i>Brucella</i> spp. a partir de muestras de sangre de bovinos y búfalos serológicamente positivos	72
3.2.2.1.1. Gen <i>omp31</i>	72
3.2.2.1.2. Gen <i>omp2ab</i>	75
3.2.2.1.2.1. Primers DSF - DSR2	75
3.2.2.1.2.2. Primers DSF - DSR	77
3.2.2.1.3. Región <i>IS711</i> - gen <i>alkB</i>	79
3.2.2.1.4. Gen <i>eri</i>	82
3.2.2.2. Evaluación de PCR para identificar <i>Brucella</i> spp. en muestras de sangre de búfalos positivos y negativos a FC provenientes de un mismo rodeo	88
3.2.2.3. Caracterización molecular de <i>Brucella</i> spp. a partir de muestras clínicas diferentes de sangre en búfalos positivos a FC	90
3.2.2.4. Cultivos	91
3.3. Caracterización biológica y molecular de una cepa de <i>Brucella</i> spp. aislada a partir de un feto abortado de una búfala de Formosa	92
3.3.1. Tipificación bacteriológica	92
3.3.2. Tipificación molecular por PCR	93
3.3.2.1. Gen <i>omp31</i>	93
3.3.2.2. Región comprendida entre el inserto <i>IS711</i> y el gen <i>alkB</i>	94
3.3.2.2.1. Primers específicos para <i>B. melitensis</i>	94

3.3.2.2.2.	Primers específicos para <i>B. abortus</i> bv1, bv2 y bv4	94
3.3.2.2.3.	Primers específicos para <i>B. abortus</i> bv3b, bv5, bv6 y bv9	95
3.3.2.3.	Gen <i>omp2ab</i>	96
3.3.2.3.1.	Primers DSF-DSR2	96
3.3.2.3.2.	Primers DSF-DSR	98
3.3.2.4.	Gen <i>eri</i>	99
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN		103
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		113
5.1.	Técnicas serológicas	113
5.2.	Diagnóstico molecular	113
5.3.	Epidemiología	113
CAPITULO VI. PROPUESTAS		114
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA		115
APÉNDICE		128
1.	Procedimientos para la realización de las técnicas de diagnóstico serológico de brucelosis	128
1.1.	Fijación del Complemento	128
1.2.	Técnica del Antígeno Bufferado en Placa	130
1.3.	Seroaglutinación en Tubo o Prueba de Wright (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2ME)	130
1.4.	Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA)	131
1.5.	Enzimoinmunoensayo de Competición (ELISA-c)	132
1.6.	Enzimoinmunoensayo Indirecto (ELISA-i)	132
2.	Pasos de la obtención de ADN para la realización de las técnicas moleculares	133
2.1.	Obtención de ADN a partir de sangre entera	133
2.2.	Obtención de ADN a partir de leche	134
2.3.	Obtención de ADN a partir de tejidos animales	134
2.4.	Obtención de ADN a partir de secreciones	135
3.	Pasos de la clonación en vectores de fragmentos de genoma de <i>Brucella</i> spp. para su posterior secuenciación	135
3.1.	Ligación	135

3.2. Transformación	135
3.3. Búsqueda de bacterias transformantes con insertos	136
3.4. Purificación	136
3.5. Composición de los reactivos utilizados en la clonación	141

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

La brucelosis es una enfermedad infecciosa que causa cuantiosas pérdidas en la producción y su aspecto zoonótico genera importantes efectos deletéreos en la salud humana (Acha y Szyfres, 1977). En Argentina está vigente el Plan Nacional de Control y Erradicación de la brucelosis bovina, que tiene como bases la vacunación con cepa 19 de *Brucella abortus*, el diagnóstico serológico y la segregación de los bovinos positivos (SENASA, Resolución 115/99).

En la primera década del siglo XX se introdujo al país ganado bubalino debido a las grandes ventajas productivas que éste ofrece bajo sistemas climáticos y pastoriles adversos para bovinos (Zava, 2004). En explotaciones ganaderas situadas en áreas bajas y anegadizas de la región nordeste, conviven ambas especies. Es sabido que los búfalos son susceptibles a la infección por *Brucella* spp. (Borghese y Mazzi, 2005), y su cohabitación con bovinos es un factor epidemiológico relevante en el aspecto de la transmisión de la enfermedad.

Las medidas de control reglamentadas para la enfermedad son aplicadas en bovinos desde el año 1999, mientras que los bubalinos han sido incorporados oficialmente al Plan Nacional de Control y Erradicación a partir de 2005, utilizándose los mismos métodos de diagnóstico (SENASA, Resolución 725/2005). La validación de los métodos de diagnóstico serológico y la caracterización de las cepas de *Brucella* spp. para la especie bubalina no han sido evaluadas en Argentina y constituyen aspectos fundamentales para establecer el rol del búfalo en la epidemiología de la brucelosis en la región del nordeste.

1.2. Importancia del estudio

Por medio de este trabajo de investigación se estableció la presencia de reactores serológicos positivos a brucelosis en bovinos y búfalos del NEA argentino y se estimó la incidencia y proporción de positivos en los últimos años a partir de datos de laboratorios de red del SENASA. Se evaluaron las técnicas serológicas clásicas reglamentadas, se analizó su eficacia en búfalos y se validaron las técnicas serológicas de nueva generación, la mayoría de reciente introducción en el plan oficial de control y erradicación. Los resultados se complementaron con el diagnóstico y caracterización molecular de *Brucella* spp. a partir de muestras biológicas de bovinos y búfalos de las diferentes regiones geográficas y de un aislamiento previo obtenido de un feto bubalino abortado.

1.3. Hipótesis y objetivos

1.3.1. Hipótesis de trabajo

Bovinos y búfalos que compartan un mismo nicho ecológico son infectados por la misma biovariedad de *Brucella* spp.

1.3.2. Objetivos

1.3.2.1. General

Realizar un estudio epidemiológico de brucelosis en búfalos y bovinos que compartan un mismo nicho ecológico del NE Argentino.

1.3.2.2. Particulares

1.3.2.2.1. Determinar la proporción de búfalos y bovinos positivos a brucelosis mediante el análisis de datos serológicos obtenidos en laboratorios de red de SENASA.

1.3.2.2.2. Evaluar los métodos serológicos clásicos y de nueva generación en búfalos.

1.3.2.2.3. Realizar un estudio seroepidemiológico de la presencia de brucelosis en rodeos bubalinos mediante la detección de anticuerpos específicos.

1.3.2.2.4. Caracterizar la especie y biovar de *Brucella* actuante en rodeos bovinos y bubalinos mediante métodos biológicos y moleculares.

1.4. Estado del conocimiento

1.4.1. Del ganado bubalino

1.4.1.1. Origen y filogenia

El Búfalo de Agua pertenece al género *Bubalus*, especie *bubalis*. Está clasificado dentro de la Clase Mammalia, Subclase Ungulata, Orden Artiodactyla, Suborden Ruminantia, Familia Bovidae, Subfamilia Bovinae, Tribu Bovini, la cual incluye a tres grupos: Bovina (vacas), Bubalina (búfalos asiáticos) y Syncerina (búfalo africano). La domesticación de estos animales ocurrió hace 5,000 años. Los dos tipos de búfalos de agua domésticos son el Búfalo de los Pantanos, con 48 cromosomas, y el Búfalo de Río, con 50 cromosomas. Ambos tipos de búfalos son descendientes del búfalo salvaje asiático (*Bubalus arnee*) y sus cruza son fértiles aunque poseen 49 cromosomas (Borghese y Mazzi, 2005).

Existen diferencias entre ambas subespecies. Una de ellas es el tamaño corporal: el búfalo de pantano es relativamente liviano, con machos de entre 325 y 450 kg, el búfalo de río pesa entre 450 y 1000 kg. Otra diferencia está determinada por la aptitud productiva: el búfalo de pantano es, principalmente, un animal de tiro, pero son frecuentemente faenados para la obtención de carne y la

producción de leche es generalmente pobre en este tipo de animal. Los búfalos de río son primariamente animales lecheros, pero los machos se faenan para carne y a menudo se los usa también como animales de tiro. Otra diferencia radica en el hábitat: mientras que el búfalo de río prefiere aguas limpias, los búfalos de pantano a menudo son criados en terrenos anegados (Borghese y Mazzi 2005).

En lo que respecta a su parentesco con la especie doméstica que mayores similitudes conserva con el búfalo, en un estudio genómico utilizando ADN mitocondrial, Abdel-Rahman (2006) determinó que búfalos y vacas comparten un antecesor común, y señala además la presencia de una serie de genes homólogos en ambas especies, si bien otros autores sitúan a la especie bubalina más cercana a los ovinos en el árbol filogenético (Mattapallil y Ali, 1999).

1.4.1.2. Distribución

La población mundial de búfalos (*Bubalus bubalis*) es actualmente de alrededor de 168 millones de cabezas, de las cuales 95,8% (161 millones) se hallan en Asia, 2,2% (3,7 millones) en África - casi enteramente en Egipto -, 2% en Sudamérica (3,3 millones), 0,02% en Australia (40,000 animales) y 0,3% en Europa (500,000 animales) (Borghese y Mazzi, 2005).

En América, el país con mayor población de búfalos es Brasil, seguido en orden decreciente por Venezuela, Argentina, Cuba, Colombia, Perú, Paraguay, Trinidad y Tobago, Ecuador y Bolivia (Borghese y Mazzi, 2005).

En Argentina existe una población de aproximadamente 60,000 animales, la tercera en importancia en América. De éstos, en la provincia de Corrientes se hallan unos 36,000, en Formosa 15,500, Santa Fe 2,200 y el resto se distribuye entre Chaco, Misiones, Entre Ríos y Buenos Aires (Zava 2004).

1.4.1.3. Tipos de producción

En su lugar de origen, Asia, y sobre todo en los países con mayor población a nivel mundial, India y China, los búfalos han logrado adaptarse a diferentes condiciones climáticas y geográficas: desde clima cálido y húmedo en India hasta la variedad de climas fríos de la China, siendo productivos en altitudes que van desde altas montañas hasta el nivel del mar. En estas regiones juegan un rol muy importante en la economía agropecuaria participando en la producción de leche, carne y trabajo, habiéndose desarrollado una gran cantidad de razas derivadas tanto del búfalo de río como del de los pantanos, con distintas orientaciones, variados propósitos y singulares producciones (Borghese y Mazzi, 2005).

En países europeos más desarrollados, como es el caso de Italia, la producción de búfalos se ha inclinado casi exclusivamente hacia la obtención de leche para la factura de productos

específicos, ya que su capacidad para el trabajo ha sido superada por la mecanización y su aptitud para la producción de leche y carne se ha reemplazado con razas bovinas lecheras y carniceras, que las producen en mayor cantidad. El queso muzzarella es el producto lácteo bubalino más reconocido, tiene una gran demanda en los mercados nacionales e internacionales y su producción está preservada mediante un certificado de Denominación de Origen Controlado. Todos los búfalos que se crían en Europa pertenecen al biotipo de río (Borghese y Mazzi, 2005).

En América se da un incremento sostenido en la cría de esta especie, debido a una serie de ventajas que la hacen muy útil. Una de ellas es su gran capacidad de convertir los forrajes tropicales y subtropicales en energía, evitando la competencia con el ser humano por nutrientes como los granos y la necesidad de producir mayor cantidad de éstos para alimentarlos. Otras características ventajosas del búfalo son su rusticidad y habilidad de adaptación, mostrando en todos los casos tasas de fertilidad superiores a las del bovino (Borghese y Mazzi, 2005).

En los países americanos se cría preferentemente el búfalo de río, cuyas distintas razas fueron introducidas desde India a finales del siglo XIX con el objeto de trabajar en las plantaciones de caña de azúcar y de proveer de leche y carne a los obreros de estas explotaciones. Existe incluso una variedad desarrollada a partir del cruzamiento de varias razas pertenecientes al tipo de río entre 1920 y 1930 en Trinidad y Tobago, llamada “Bufallypso” o Búfalo de Trinidad. Exhibe esta variedad mejoras en sus rendimientos como productora de leche. En Brasil el ganado bubalino se utiliza para la producción de carne y leche y dentro de esta última opción, se produce un queso muzzarella que fue muy aceptado en el mercado consumidor (Borghese y Mazzi, 2005).

En Argentina la producción de búfalos representa una opción importante como fuente de ingresos en aquellos establecimientos ganaderos ubicados en terrenos bajos, anegables y pantanosos con climas tropical y subtropical y en campos con pastizales naturales de bajo valor nutritivo. Actualmente los rodeos bubalinos son destinados a la producción de leche y carne, además de las utilidades que prestan en la industria del cuero (Crudelli *et al.*, 1997 y 2004).

1.4.1.4. Búfalos en Argentina

La especie bubalina se introdujo en Argentina en la primera década del siglo XX, cuando fueron traídos desde Brasil búfalos de raza Mediterránea con la intención de cruzarlos con bovinos. Como esto, por cuestiones de incompatibilidad de especies, no ocurrió, los animales fueron abandonados en las estancias y destinados para consumo interno. Por falta de manejo se volvieron indóciles y consanguíneos. En la década de 1970 se interesaron en esta especie los productores de la cuenca del río Paraná, que vieron la oportunidad de explotarla en los campos bajos, poco aprovechables para los bovinos. En esos primeros momentos se los destinó sólo a la producción de

carne, pero más recientemente se incorporó genética lechera desde Italia, Brasil y Paraguay. También se los utilizó para la producción de cueros, ya que éstos duplican en peso y rendimiento a los de los bovinos (Zava, 2004).

1.4.1.4.1. Distribución de bubalinos en los dominios fitogeográficos de Argentina

Están descriptas en Argentina regiones diferenciadas según clima, topografía y vegetación denominadas Dominios Fitogeográficos, que poseen a su vez subdivisiones en “distritos” con características particulares (Cabrera, 1976).

Salvo unas pocas excepciones, los rodeos bubalinos de Argentina se explotan en los dominios fitogeográficos denominados Amazónico y Chaqueño (Cabrera, 1976), dado que son las regiones del país que reúnen las condiciones de suelo y vegetación donde los bovinos son menos eficientes que los bubalinos en lo referente a su adaptación y producción (Figura 1).

El dominio Amazónico Paranaense cubre todo el territorio de Misiones y el nordeste de Corrientes. El clima es cálido y húmedo, con heladas invernales. Hay precipitaciones todo el año, de entre 1500 y 2000 mm anuales. La temperatura media es de entre 20 y 21 °C. El tipo predominante de vegetación es la selva, con una gran densidad y riqueza florística. Las selvas marginales forman galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay y se fusionan en este dominio con el “distrito de los campos”, donde predominan las sabanas de gramíneas. Corresponden a este dominio los rodeos bubalinos ubicados en la franja norte y este de la provincia de Corrientes, donde la geografía es variable, predominando los terrenos llanos que alternan con bajíos (Cabrera, 1976).

El dominio Chaqueño cubre la mayor parte de la República Argentina. Su vegetación es polimorfa, hay bosques caducifolios, estepas arbustivas, palmares, sabanas, praderas, pajonales, etc. El clima es variado, predominando el continental, con lluvias moderadas a escasas, inviernos moderados y veranos cálidos. Dentro de este dominio los búfalos se distribuyen en las subregiones del Chaco Espinal y el Chaco Oriental. El Chaco Espinal se extiende por el centro de la provincia de Corrientes y se caracteriza su relieve por presentar llanuras poco onduladas. El clima de la parte norte de esta región es cálido y húmedo, con precipitaciones principalmente estivales. La vegetación alterna entre bosques de diversas especies, pajonales, palmares y diversas gramíneas y arbustos. El Chaco Oriental, que abarca además del noroeste de la provincia de Corrientes, al este de la provincia de Formosa, ocupando aproximadamente su mitad oriental, se caracteriza por un clima muy húmedo, disminuyendo las precipitaciones de este a oeste. La vegetación está compuesta por bosques que alternan con palmares y sabanas. Cerca de los ríos existen selvas marginales similares a los de la provincia paranaense. En los terrenos bajos hay camalotales y embalsados.

Debe destacarse que la vegetación de todo el Dominio Chaqueño ha sido profundamente alterada por la explotación forestal y ganadera (Cabrera, 1976).

Figura 1. Regiones fitogeográficas de la Argentina.



FIGURA 1. Dominios fitogeográficos argentinos y sus provincias adaptados de varias fuentes:

- Dominio Amazónico, 1 Yungas, 2 Paranaense.
- Dominio del Chaco, 3 Chaco y sus distritos (3a Serrano, 3b Occidental, 3c Oriental), 4 Pampeana, 5 Espinal, 6 Monte.
- Dominio Andino-Patagónico, 7 Puna, 8 Patagónica, 9 Subantártica.

Fuente: Guglielmone, 2006.

1.4.2. De la *Brucella*

1.4.2.1. Reseña histórica

El primer diagnóstico bacteriológico de este agente fue reportado por Bruce y colaboradores en 1887, cuando aislaron *Brucella melitensis* en personal militar en la isla de Malta. En aquel momento se le dio el nombre de *Micrococcus melitensis* al organismo aislado de tejidos esplénicos de humanos que habían muerto como resultado de “Fiebre ondulante” (Dalrymple-Champneys 1950a, 1950b, citado por Cutler *et al.*, 2005). La enfermedad tenía origen en cabras infectadas y se conocía desde 1859.

Bang aisló *Brucella abortus* en 1897 a partir de vacas infectadas y le dio el nombre de *Bacterium abortus*. *Brucella suis* fue descrita por primera vez por Traum en 1914, como agente causal de abortos en cerdas. En 1918 la bacterióloga Alice Evans demostró la estrecha relación entre las bacterias aisladas por Bruce y por Bang y señaló también que los anticuerpos producidos en infecciones humanas por *M. melitensis* eran indistinguibles de aquellos producidos por *Brucella abortus*. En 1920, Meyer y Shaw propusieron la creación del género *Brucella* para agrupar a todas las bacterias mencionadas (Spink, 1956; Nielsen, 2002). El primer aislamiento de *Brucella ovis* en un carnero se atribuye a McFarlane y colaboradores en 1950, siendo Buddle quien propuso su denominación como tal. En 1968, Carmichael y Bruner reportaron el primer aislamiento de *Brucella canis* en una perra. En 1994 se informó del aislamiento de especies de *Brucella* en la foca común (*Phoca vitulina*) y dos especies de delfín (*Delphinus delphis* y *Tursiops truncatus*). Desde ese momento se han reportado aislamientos o seropositividad en numerosos mamíferos marinos del Ártico, Atlántico Norte y Sur y la Antártida. Se propuso denominar *Brucella maris* a dichos agentes (Jahans *et al.*, 1997), pero más recientemente se ha demostrado que las especies que afectan a cetáceos y pinnípedos son distintas y recibieron la denominación de *Brucella ceti* y *Brucella pinnipediae*, respectivamente (Bricker *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2007).

En Argentina la enfermedad se conoce desde el siglo pasado y su primera descripción fue hecha por Bernier en 1892 en Buenos Aires (citado por Bowden *et al.*, 2007).

En búfalos, los primeros estudios de susceptibilidad a la brucelosis fueron llevados a cabo por Gabbi y Cantani en 1933, quienes trabajaron con inoculaciones experimentales de *B. abortus* y *B. melitensis* en hembras bubalinas (citados por Mohan, 1968).

1.4.2.2. Taxonomía

El género *Brucella* está conformado por ocho especies terrestres y, al menos, dos marinas. Las *Brucellas* terrestres son *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y dos nuevas especies, *B. microti* y *B. inopinata*. (OIE, 2008). Las especies marinas son *B. ceti* y *B. pinnipediae* (Foster *et al.*, 1996) y están aún en investigación.

A través de estudios de hibridación de ADN se hizo evidente la gran homogeneidad genética dentro de los integrantes terrestres del género *Brucella*, donde todos los miembros muestran una homología cercana al 96%. Basados en este hecho, Verger *et al.* (1985) propusieron que se clasifique a *Brucella* como un género monoespecífico, conformado por *B. melitensis* como única especie, y a todas las cepas halladas como biovars de *B. melitensis* – por ej. *B. melitensis* biovar Abortus 1. Sin embargo esta propuesta no ha prosperado y se sigue utilizando la denominación clásica de las especies anteriormente mencionadas (Osterman y Moriyan, 2003)

debido a las diferencias halladas en la patogenicidad y preferencia de hospedador, sustentadas por los modernos estudios de postgenómica (Chain *et al.*, 2005). *Brucella* spp. pertenece a una rama monofilética de subgrupo alpha-2-proteobacteria, cuyos miembros exhiben la habilidad de establecer asociaciones intracelulares con células eucariontes a través de diversos mecanismos de patogénesis, como lo son las exotoxinas, factores de adherencia y moléculas que influyen en el ingreso a las células o que interfieren en la inmunidad del hospedador (Ugalde, 1999).

1.4.2.3. Morfología y estructura antigénica

Brucella es un cocobacilo gramnegativo acapsulado, no esporulado e inmóvil cuyo tamaño varía de 0,5-0,7 μm x 0,6-1,5 μm . Dentro de los constituyentes bacterianos principales se describe, como en otros microorganismos gramnegativos, una envoltura celular formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio. Éste contiene algunas enzimas y proteínas que intervienen en el transporte de sustancias y un gel glucopeptídico – peptidoglicano – que determina la forma y la integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa presenta, asimétricamente distribuidos, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS), considerado el principal antígeno (Bowden *et al.*, 2007).

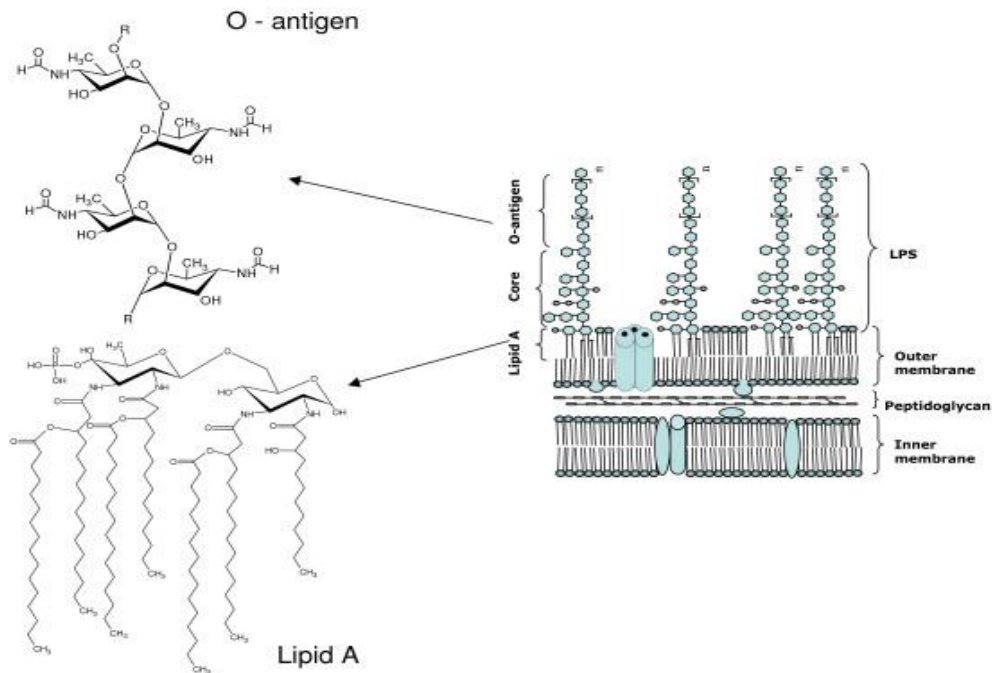
1.4.2.3.1. Lipopolisacáridos (LPS)

Las distintas cepas de *Brucella* son clasificadas habitualmente como lisas (“smooth”-S) o rugosas (“rough”-R) según el aspecto de las colonias obtenidas por cultivo en medio sólido. Esto depende de las particularidades en la expresión del LPS en la superficie de las bacterias. Este LPS es, además, el antígeno que domina la respuesta inmune. En su estructura se distinguen tres regiones que difieren en los aspectos genéticos, químicos y biológicos (Figura 2). Ellas son: el lípido A, que está inserto profundamente en la hoja externa de la membrana externa; un oligosacárido intermedio, llamado núcleo o “core” y el polisacárido O (OPS), que recibe también el nombre de cadena o antígeno O (Corbel, 1997; Bowden *et al.*, 2007).

En las cepas lisas la estructura del S-LPS incluye al lípido A – que contiene dos tipos de aminoglicosa y distintos ácidos grasos –, una región central y una cadena O que comprende un homopolímero de aproximadamente 100 residuos de 4-formamido-4,6-dideoximanosa. La presencia de 4-formamido-4,6-dideoximanosa en las LPS es responsable de la reacción serológica cruzada con *Escherichia hermanni* y *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1 y *Yersinia enterocolitica* (Corbel *et al.*, 1997). Los antígenos A y M, definidos como los antígenos dominantes en *B. abortus* y *B. melitensis*, respectivamente, son estructuras presentes en el OPS del S-LPS. El modo de unión de los polímeros determina el tipo de antígeno: la unión es predominantemente α -1,2 en aquellas con epítipo A dominante y α -1,3 en las

epítipo M dominante. El modo según el cual se alternan las uniones antes mencionadas determina la configuración de epítipes A o M, y éstos son importantes en la definición de las biovariedades de *Brucella* (Bowden *et al.*, 2007).

Fig. 2. Estructura de los LPS de la membrana externa de *Brucella*.



Esquema de la composición de las membranas de *Brucella*. Composición de las moléculas de Antígeno O (O-antigen), Lípido A (Lipid A), su ubicación dentro de los lipopolisacáridos (LPS) y su relación con los componentes de la membrana externa (Outer membrane), peptidoglicano (Peptidoglycan) y la membrana interna (Inner membrane). Fuente: Gomes Cardoso *et al.*, 2006.

La estructura de LPS en cepas rugosas (R-LPS) es básicamente similar a las S-LPS, excepto porque la cadena O está ausente o se reduce a unos pocos residuos (Corbel *et al.*, 1997).

El OPS es la porción más distal del LPS-S respecto del soma bacteriano y por ello, la más expuesta. Existe una heterogeneidad manifiesta en la longitud de estas moléculas (Bowden *et al.*, 2007).

Brucella melitensis, *Brucella abortus* y *Brucella suis* son las especies con mayor contenido de polisacárido-O (Bundle *et al.*, 1987), mientras que *Brucella ovis* y *Brucella canis* no contienen OPS medibles en su superficie celular (Nielsen, 2002).

Las tres especies que contienen OPS son diagnosticadas serológicamente usando un antígeno de célula entera o lipopolisacáridos lisos (SLPS) preparados por extracción química, mientras *B. ovis* y *B. canis* son principalmente diagnosticadas usando lipopolisacáridos rugosos (RLPS) o antígenos proteicos (Blasco, 1990).

Debido a que se hallan epitopes comunes en los SLPS de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, todos los tests diagnósticos para anticuerpos contra esas bacterias utilizan antígeno de *B. abortus* (OIE, 2000a y 2000b), mientras que para las especies rugosas se utilizan antígenos de cada una de ellas (Blasco, 1990 y Carmichael, 1990).

Además de los epitopes A y M existen otros comunes, llamados “C” y que pueden hallarse indistintamente en cadenas A o M, siendo algunos exclusivos de *Brucella* y otros compartidos con especies emparentadas, como *Yersinia* (Bowden *et al.*, 2007).

1.4.2.3.2. Proteínas de la Membrana Externa (OMPs)

Existe un número importante de proteínas, más o menos abundantes según su tipo, algunas porinas, otras lipoproteínas y algunas aún no definidas, que se asocian estrechamente con los LPS. Entre ellas se destacan las proteínas mayores (Outer Membrane Proteins: OMPs), que según su peso molecular se dividen en tres grupos: grupo 1, con un peso de entre 89 y 94 kDal; grupo 2, con pesos entre 36 y 38 kDal y grupo 3 entre 25-27 y 31-34 kDal (Dubray y Bézard, 1980; Verstrete *et al.*, 1982). A través de diversos estudios se ha establecido la inmunogenicidad de las OMP y su posible utilización en la elaboración de vacunas, tanto en cepas lisas como rugosas de *Brucella* (Cloeckert *et al.*, 1992; Zygmunt *et al.*, 1994; Bowden *et al.*, 1995), y a través de los avances en genómica y proteómica se siguen investigando nuevos miembros de estas familias de proteínas para establecer sus funciones y potencialidad (Salhi *et al.*, 2003). Utilizando anticuerpos monoclonales, Cloeckert *et al.* (1999), identificaron otras proteínas de membrana menos abundantes que se denominan proteínas menores, siendo algunas de ellas lipoproteínas.

1.4.2.3.3. Componentes del periplasma

El espacio periplásmico está limitado por las membranas externa e interna y ocupado por el mucopéptido, a su vez formado por peptidoglicano con glucosamina, ácido murámico, alanina, ácido glutámico y ácido α -diaminopimélico (Bowden *et al.*, 2007). Usando técnicas de biología molecular, Rossetti *et al.* (1996) han identificado una proteína de 26-kDa (BP26) que tendría utilidad diagnóstica en la diferenciación de bovinos vacunados y no vacunados, además de permitir la identificación de carneros infectados y humanos con infecciones activas causadas por *Brucella* spp. Dentro de este grupo de antígenos, también Bricker *et al.* (1990), lograron identificar y clonar una superóxido dismutasa que identificaría ciertos biovares de *Brucella* spp.

1.4.2.3.4. Antígenos citosolubles

Existe gran variedad de moléculas en el citosol que se comportan como antígenos y que, mediante los avances en los estudios gracias a métodos de biología molecular, están siendo definidos, clonados y expresados en forma recombinante, todo ello con el objeto de caracterizarlas y

definir su actividad biológica (Bowden *et al.*, 2007). Dentro de este grupo se han identificado, por ejemplo, proteínas ribosomales (Corbel, 1976; Ribeiro *et al.*, 2002), proteínas implicadas en la biosíntesis de sacáridos (Rosinha *et al.*, 2002), una proteína involucrada en el metabolismo del hierro (Denoel *et al.*, 1995). Se han descrito además proteínas relacionadas con el estrés térmico (Lin *et al.*, 1992). Existen muchas otras moléculas de actividad desconocida pero que también han sido identificadas como antígenos de *Brucella* capaces de ser utilizados en la elaboración de pruebas diagnósticas y vacunas.

1.4.2.4. Mecanismos de evasión

Martirosyan *et al.* (2011) calificaron al comportamiento de *Brucella* dentro del hospedador como “sigiloso y furtivo” dado que en los primeros momentos de la infección están ausentes las respuestas proinflamatorias tempranas y hay muy pocos signos de endotoxicidad. El autor hipotetiza que el prolongado tiempo de incubación asociado con una baja activación de la inmunidad innata, abre una “ventana inmunológica” que favorece a la bacteria para su replicación dentro del sistema reticuloendotelial. Luego de este prolongado período de incubación se monta una inmunidad adaptativa y los síntomas se hacen evidentes (Spink, 1956).

No hay duda de que las manifestaciones clínicas se deben al aumento de la población de esta bacteria luego de su ingreso al organismo hospedador. Este incremento se debe a su habilidad para eludir los mecanismos de defensa innata y proliferar dentro de células fagocíticas (Ko y Splitter, 2003). *Brucella*, luego de ser incorporada al fagosoma de la célula, resiste la destrucción que sigue a la fagocitosis por neutrófilos gracias a la liberación de sustancias que inhiben los mecanismos antibacterianos de las células (Canning *et al.*, 1986; Riley y Robertson, 1984) y replica en macrófagos – como se evaluó en modelos con células murinas *in-vitro* – y fagocitos no-profesionales (Jones y Winter, 1992; Detiellieux *et al.*, 1990). La supervivencia dentro de los macrófagos es la responsable del estado crónico de la enfermedad, ya que gracias a esta adaptación la bacteria puede escapar de los mecanismos de defensa extracelular como el complemento y los anticuerpos (Ko y Splitter, 2003). Se ha demostrado que la resistencia a la infección con *Brucella* encontrada en diversas especies animales es dependiente del gen *Nramp1B* homocigota. En aquellos animales resistentes, se genera un ambiente desfavorable para la replicación de la bacteria dentro de los macrófagos mediante el incremento en los radicales libres y una mayor proporción de fagolisosomas (Borriello *et al.*, 2006; Capparelli *et al.*, 2007).

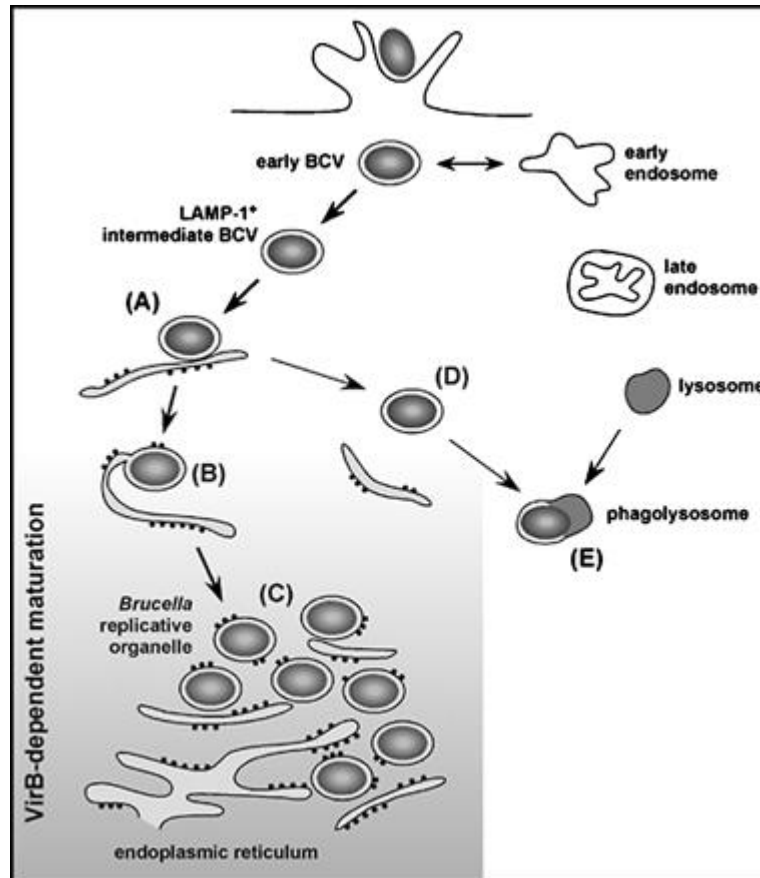
Brucella posee la habilidad de infectar, además de las células fagocíticas, a aquellas de la línea epitelial, tejidos respiratorios, neuronas, tejidos reproductivos y otros (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000). Como otros agentes infecciosos intracelulares, *Brucella* requiere de cuatro instancias de

interacción con su célula hospedador: adherencia, invasión, establecimiento y diseminación (Finlay y Falcow, 1989). Los anticuerpos y el complemento estarían asociados a los procesos de adherencia e invasión entre *Brucella* y su célula hospedadora. En los macrófagos este agente sobrevive y se multiplica gracias a que evita la fusión entre fagosoma – lisosoma a través de la inmediata acidificación del fagosoma que sigue a su introducción dentro de éste. De esta manera, el fagosoma del macrófago se convierte en el nicho intracelular de este patógeno y ha dado en llamarse “brucelosoma”, poseyendo características que la distinguen de las demás organelas (Köhler *et al.*, 2003). Finalmente, las bacterias allí acumuladas se diseminan hacia otras células. La patogenicidad de esta bacteria intracelular está relacionada con los mecanismos que despliega para evadir el sistema inmune del hospedador (Ko y Splitter, 2003).

Las características que permiten a *Brucella* infectar a sus hospedadores son varias, a saber:

- Su habilidad para resistir muchas sustancias bactericidas intracelulares, relacionada con la estructura altamente hidrofóbica de su envoltura celular que es rica en distintas moléculas lipídicas (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Esto genera una reducción considerable de moléculas cargadas en la superficie celular, lo cual hace que la bacteria no se una al complemento, defensinas microbicidas, o cualquier otra molécula bactericida catiónica, como así también a la lisozima, fosfolipasa y lactoferrina contenidas en los lisosomas.
- Su capacidad para evitar la fusión de la vacuola que contiene al agente con los lisosomas de la célula hospedadora, permitiendo que la bacteria migre hacia su nicho de replicación (Figura 3). Desde el momento inicial, *Brucella* interactúa con las organelas de la célula, permitiendo su llegada sin ser afectada por las enzimas hasta el Retículo Endoplásmico, el que se constituye en un sitio que asegura su replicación y virulencia. Estos eventos están regulados por una serie de moléculas que alteran varios procesos celulares (Martirosyan *et al.*, 2011) y que serían excretadas atravesando la membrana celular de la bacteria hacia el citosol de la célula hospedadora mediante un sistema de secreción de tipo IV, codificado por la región *virB* del genoma, y que está presente en *Brucella* al igual que en otros procariotes (Álvarez-Martínez y Christie, 2009). Este sistema de secreción también podría actuar de manera mecánica, anclando la bacteria a las membranas de las organelas. Existen también otras moléculas que contribuyen en esta instancia, que no utilizan el sistema de secreción y están presentes en el espacio periplásmico, y cuya manera de ser liberadas desde las bacterias es aún objeto de investigación. Se postula además que los LPS de la envoltura de *Brucella* cumplen un rol en el tráfico intracelular luego de la invasión al hospedador (Martirosyan *et al.*, 2011).

Fig. 3. Ingreso y permanencia de *Brucella* dentro de la célula hospedadora.



Luego de ingresar, *Brucella* reside intracelularmente dentro de una vacuola (BCV) que interactúa con los endosomas tempranos. Estos endosomas tempranos (BCVs) evitan futuras interacciones con la vía endocítica, allí adquiere LAMP-1 y es encontrado alrededor o en contacto estrecho con el retículo endoplásmico (ER) dentro de las primeras horas después de la infección (A). Dichas interacciones se sostienen a lo largo del tiempo y resultan en eventos de fusión restringidos (B), que generan una organela derivada del retículo endoplásmico que permite la replicación de *Brucella* (C). Las vacuolas que contienen una bacteria mutante en el gen *virB* fallan en la sustentación de las interacciones para la fusión con el retículo endoplásmico (D) y por último se fusionan con lisosomas (E). El área sombreada designa los eventos dependientes de VirB. Fuente: Celli *et al.*, 2003.

- La ausencia de alteraciones significativas en el hospedador luego de la penetración. En contraste con otros patógenos intracelulares, la invasión de *Brucella* no induce cambios espectaculares en la membrana citoplasmática de la célula hospedadora, ni activa macrófagos o induce la maduración de células dendríticas, todas ellas implicadas en la defensa del organismo (Anderson *et al.*, 1986; Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008).
- Su capacidad para remodelar extensamente su envoltura celular y modificar reversiblemente sus vías biosintéticas y de respiración, para adaptarse al microambiente variable de la célula hospedadora. En esta instancia, *Brucella* evita la secreción de sustancias que inducen daño celular, como endotoxinas o exozimas, y tampoco invade el

núcleo de la célula o escapa de la vacuola que la contiene (Lamontagne *et al.*, 2009). También se ha demostrado que las células infectadas liberan muy pocas cantidades de citoquinas durante los primeros días de la infección (Weiss *et al.*, 2005). En este aspecto, diversos estudios demuestran que la bacteria ha evolucionado para proteger su célula hospedadora de una muerte prematura y así asegurarse de un lugar sostenible para su replicación. Sin embargo, este proceso finaliza cuando la replicación de la bacteria dentro de la célula se completa totalmente. Entonces *Brucella* es liberada cuando la célula infectada muere (Martirosyan *et al.*, 2011).

- La evolución de *Brucella*, desde un antecesor de vida libre a su actual estilo de vida intracelular, ha llevado a la bacteria a cambiar su fenotipo en contacto con la inmunidad del hospedador y, paralelamente, a reducir su expresión génica, remover plásmidos y disminuir al mínimo sus alternativas metabólicas (Moreno, 1998). En comparación con otras proteobacterias patógenas como *Salmonella* o *Neisseria*, *Brucella* está desprovista de muchas estructuras clásicamente involucradas en la virulencia como pili, fimbrias, cápsula y plásmidos (Fretin *et al.*, 2005). Además de esto, tanto las bacterias vivas como muertas contienen cantidades significantes de sustancias que son inmunógenos débiles, como lipoproteínas, lípidos conteniendo ornitina, LPS y polisacáridos relacionados (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

1.4.2.5. Genoma

Existe una gran similitud entre los genomas de los distintos miembros del género *Brucella* (Verger *et al.*, 1985). Una identidad mayor al 94% de nucleótidos fue encontrada entre *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* con diferencias específicas para cada especie. Las secuencias correspondientes se hallan disponibles en el GeneBank (Chain *et al.*, 2005).

El genoma de *B. abortus* está compuesto por dos cromosomas circulares, ChrI de 2.12 y ChrII de 1.15 Mpb (Michaux-Charachon *et al.*, 1997). Las diferencias entre especies fueron verificadas mediante aspectos a) genéticos, como pseudogenes, inserciones – mayormente debidas a fagos – y deleciones; b) fenotípicos, como características bioquímicas y de composición de ácidos grasos y c) epidemiológicos, como la especificidad de hospedador de cada especie de *Brucella*. Se verificaron además cambios derivados de la adaptación de la bacteria a la vida intracelular, como la insuficiencia de vías metabólicas para la síntesis de numerosos compuestos como son el glicógeno – excepto aquel gen que le confiere virulencia al participar en la formación del lipopolisacárido del antígeno O -, biotina, NAD y colina y la reducción de componentes de envoltura celular, derivados de su desarrollo en un ambiente protegido que provee un constante flujo de nutrientes

y es escaso en oxígeno (Moreno *et al.*, 2002).

1.4.2.6. Filogenia

Desde hace años se trata de establecer relaciones entre las distintas especies de *Brucella*. En 2002, Moreno *et al.* establecieron parámetros de filogenia, a pesar de las dificultades que presenta un genoma tan uniforme y el consecuente escaso polimorfismo que caracteriza a las especies de este género.

Más recientemente, Foster *et al.* (2009) realizaron un estudio filogenético trabajando con genomas completos de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. canis* y comparando éstos con el de *Ochrobactrum anthropi*, la bacteria más cercana taxonómicamente. El estudio se basó en análisis de polimorfismo de nucleótido simple, el cual compara mutaciones de un solo nucleótido estables a través de generaciones. El trabajo además comparó genes ortólogos – aquellas secuencias homólogas que se separan mediante un evento de especiación – e incluyó un “reloj” molecular, basado en la acumulación de mutaciones en cada especie. Las conclusiones fueron que a) hay una fuerte diferenciación entre las especies antes mencionadas y cada una de ellas tiene la suficiente distancia genética de las otras como para acceder al status de especie; b) *B. ovis* fue la primera rama en escindir del árbol filogenético del género *Brucella* y constituye la raíz del linaje; c) el clado – llámese de ese modo a cada una de las ramas del árbol – derivado de *B. suis* exhibió una considerable diversidad genética; e) *B. canis* surgió como un clon dentro del clado de *B. suis* entre 7.500 y 22.000 años atrás y es relativamente cercana al biovar 4 de dicha especie f) *B. abortus* y *B. melitensis* son especies hermanas; g) hay una mínima diversidad genética dentro del genoma del biovar 1 de *B. abortus*, el más ampliamente difundido y común; opuestamente, los tres biovars de *B. melitensis* exhiben una amplia variabilidad genética luego de la separación de su antecesor común; h) la cepa S19 (vacunal) es muy cercana a la cepa 2308 (estándar) de *B. abortus* y se han separado entre 2.200 y 6.500 años atrás (Figura 4).

Figura 4. Árbol filogenético de *Brucella*

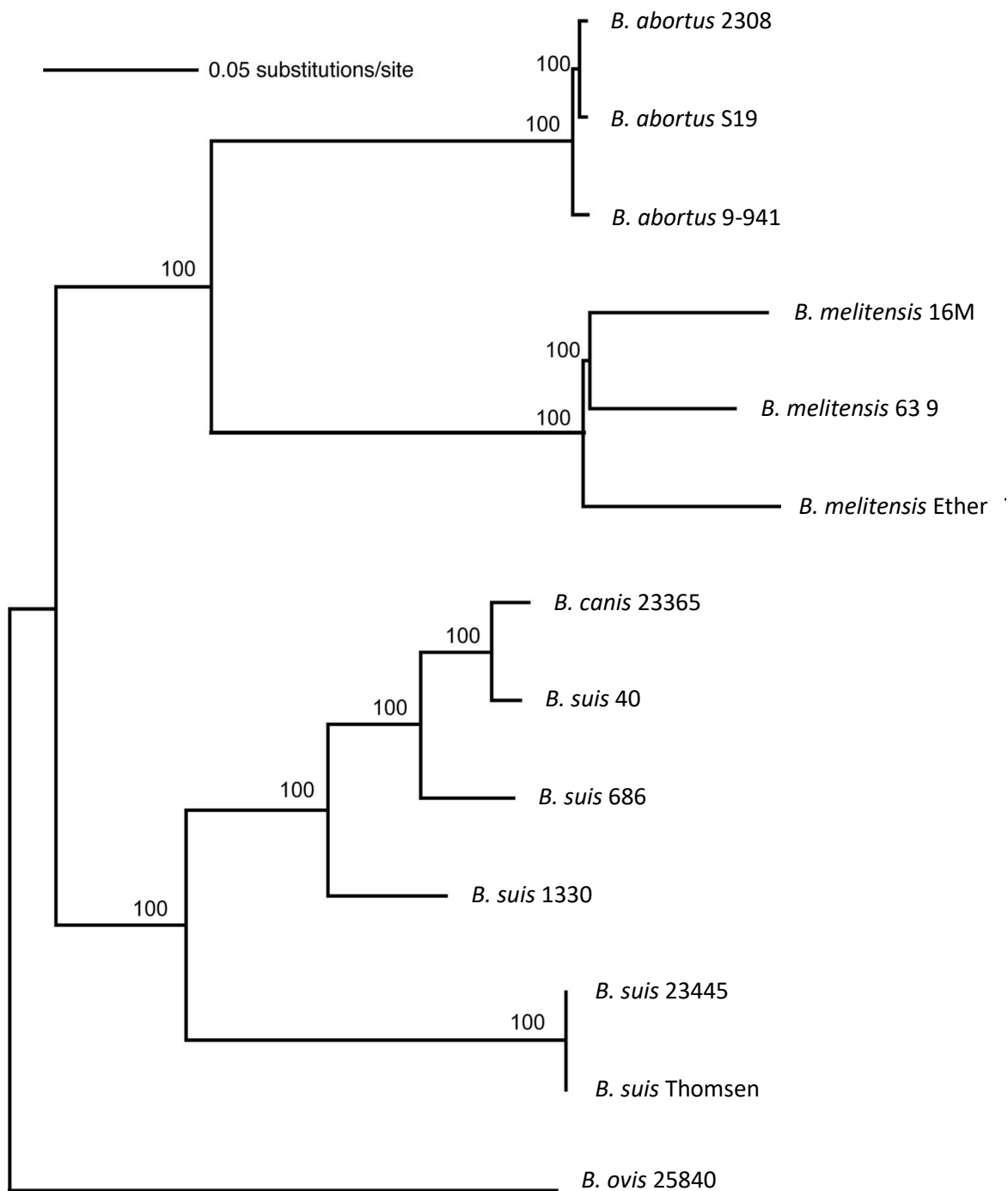


Figura 3. Árbol filogenético del género *Brucella*, que incluye 13 genomas de cinco especies. El árbol fue construido usando “neighbor joining”. El análisis utilizando “maximum parsimony” originó la misma topología, y el porcentaje de “bootstrap” basado en 1,000 repeticiones se muestra en cada nodo. El “outgroup” *O. antrphi* fue usado para construir este árbol pero no se muestra debido a la longitud de la rama. Fuente: Foster *et al.*, 2009.

Estos hallazgos sugieren que la brucelosis en cerdos, cabras y bovinos surgió por contacto entre estos animales y ovejas infectadas, siendo este contacto reciente, ocurrido en los pasados 86.000 a 296.000 años. Dado que los reportes sitúan a la domesticación de estas especies en los últimos 10.000 años, se sugiere que la brucelosis ocurría en estas poblaciones animales en estado silvestre, y se opone a investigadores que hipotetizaban que las especies de *Brucella* habrían surgido en el mismo momento de la divergencia de sus especies hospedadoras, ocurridas hace 20 millones de años. Estos hallazgos además sitúan a *B. ovis* muy distante de *B. melitensis*, aún cuando sus hospedadores ovinos y caprinos son relativamente cercanos y establecen a *Brucella* como un género de bacterias relativamente joven. Mediante este estudio se concluyó que la adquisición de infecciones con *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* ocurrió recientemente en la historia. La transmisión de *Brucellae* desde suinos a caninos se estima como una infección de lobos u otros cánidos con un antecesor de *B. suis* en los pasados 22.500 años (Foster *et al.*, 2009).

El aislamiento genético de las especies de *Brucella* es el resultado de su limitado nicho ecológico, de que su dificultoso crecimiento sólo ocurre en los hospedadores y no así en el ambiente, de que – al menos no ha sido demostrado – no ocurren en este género los mecanismos conocidos de intercambio genético como plásmidos, fagos o transformación, y de su virulencia restringida en sólo uno o en pocos hospedadores (Michaux-Charachon *et al.*, 1997).

1.4.3. De la brucelosis

1.4.3.1. Generalidades

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por las diferentes especies de *Brucella* mencionadas anteriormente, que se transmite al hombre y genera un marcado impacto económico-social tanto en humanos como en animales (Acha y Szyfres, 1977). La mayoría de los estudios donde se describe la enfermedad han sido basados en la brucelosis bovina.

1.4.3.2. Zoonosis

Brucelosis es la mayor enfermedad infecciosa zoonótica en el mundo (Cutler *et al.*, 2005) y constituye un serio problema para la salud pública en todos aquellos lugares donde el agente infeccioso es endémico (Montagnaro *et al.*, 2008). Aunque es de baja mortalidad, se presentan más de 500.000 nuevos casos anualmente (Pappas *et al.*, 2006).

Desde muy temprano en la historia de la humanidad esta enfermedad constituye uno de los mayores problemas para la salud pública en el mundo. Es una dolencia prolongada e invalidante, que se manifiesta por fiebre ondulante, además de problemas articulares – espondilitis –, complicaciones neurológicas – cambios en la personalidad, amnesia, delirios y alucinaciones, fobias e irritabilidad–, cefalea frontal u occipital pronunciada, anorexia y dolor abdominal (Dalrymple-

Champneys 1950a, citado por Cutler *et al.*, 2005). De todas las especies, *B. melitensis* es el agente que causa la enfermedad clínica más grave en el hombre (Corbel, 1997).

La distribución de la brucelosis humana ha cambiado mucho a lo largo del tiempo y es así que en la actualidad y gracias a cambios en las políticas sanitarias entre otras cuestiones, muchos países donde se la consideraba endémica – como Francia, Israel y la mayor parte de América Latina – han conseguido llegar al control de la misma y, por otra parte, se comporta como una zoonosis emergente en países de Asia Central – como Siria – y aún permanece en regiones de Europa y Norteamérica (Pappas *et al.*, 2006).

La real incidencia de brucelosis humana es desconocida. Lo reportado en áreas endémicas es ampliamente variable, desde menos de 2 a más de 500 casos cada 1.000.000 de habitantes (Pappas *et al.*, 2006). Argentina y Perú son considerados como áreas endémicas dentro de Sudamérica, con un predominio de casos de *B. melitensis* y *B. abortus*, aunque el hecho de que no haya reportes de otros países latinoamericanos podría deberse a fallas en la notificación y no a la inexistencia de casos (Pappas *et al.*, 2006; Samartino, 2002).

La enfermedad humana fue descrita por primera vez en Argentina en un caso de brucelosis debida a *B. melitensis* reportado por Molinari en 1930 (citado en Samartino, 2002). En el país constituye una patología eminentemente ocupacional, con la mayoría de los casos ocurridos entre empleados de frigoríficos y trabajadores rurales que cursan infecciones debidas a *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*. También son formas de contagio la autoinfección con cepas vacunales y la adquisición de enfermedad por consumo de alimentos inseguros (Samartino, 2002). La transmisión entre personas vía transfusiones de sangre y médula ósea y, eventualmente, por transmisión sexual ha sido reportada, pero es insignificante (Mantur *et al.*, 1996).

La prevención de brucelosis en el hombre depende de la erradicación y el control de la enfermedad en los animales, de los cuidados tendientes a limitar la exposición de tipo ocupacional y del tratamiento eficaz de los alimentos que podrían ser fuente de infección (Corbel *et al.*, 1997).

1.4.3.3. La enfermedad en bovinos y búfalos

En vacas el signo predominante es el aborto en el último tercio de la gestación y, con menor frecuencia, partos prematuros de terneros débiles o muertos. Al aborto pueden seguir retención placentaria, endometritis e infertilidad. Las hembras no preñadas cursan una infección subclínica que generalmente se activa con la madurez sexual y la gestación. El período de incubación es muy variable, pudiéndose detectar la enfermedad después de un año de haberla adquirido (O'Hara y Christiansen, 1978). Las crías de vacas con brucelosis pueden adquirir la infección en el útero o por la ingestión del calostro o leche contaminada y mantenerla de manera latente hasta la primera

gestación (Plommet *et al.*, 1973). En el toro *Brucella* puede localizarse en los testículos y glándulas genitales anexas, siendo poco probable la transmisión a hembras a través del semen contaminado (King, 1940; Philippon *et al.*, 1971; Thomsen, 1943).

La brucelosis bovina ocasiona pérdidas en la producción por terneros muertos, abortos y disminución de la producción de leche debida al menor número de pariciones. Además implica un incremento en la reposición de vacas infectadas, lo que constituye un costo adicional. En Argentina, las pérdidas económicas han sido estimadas entre 42 y 66 millones de dólares anuales (García-Carrillo, 1990; García-Carrillo y Lucero, 1993). La presencia de esta enfermedad influye negativamente en la rentabilidad de las explotaciones e impacta en la calidad higiénico-sanitaria de los productos para consumo humano. Limita además la comercialización internacional del ganado en pie, semen y de los derivados de carne y leche (SENASA, Resolución 115/99).

En búfalos, *Brucella abortus* es el principal agente de la brucelosis (Borghese y Mazzi, 2005) e infecta búfalos domésticos en varios países del mundo, pero sólo unos pocos desarrollan signos clínicos, como el aborto espontáneo (Borriello *et al.*, 2006).

Si bien típicamente esta enfermedad causa abortos en gestaciones avanzadas, hay reportes de que en la especie bubalina la pérdida de la gestación ocurre entre los 3,5 y 4,5 meses de gestación, relativamente antes que en bovinos (Das *et al.*, 1990). Al igual que en bovinos, la hembra bubalina permanece infectada sin abortar en gestaciones subsecuentes (Nicoletti, 1992).

Aunque no se ha evaluado directamente la transmisión entre madre y cría, las búfalas excretarían bacterias viables a través de la leche, tal como se evidenció en un estudio comparativo entre terneros bovinos y bubalinos alimentados con leche de hembras seropositivas y seronegativas, donde se evaluó la relación epidemiológica entre el estatus serológico de madres y crías. Los terneros búfalos nacidos de hembras positivas seroconvirtieron hacia la positividad en una proporción significativamente mayor que aquellos nacidos de hembras negativas (43,3% vs. 8,8%, respectivamente), evento que no se dio de igual manera, determinando una relación no significativa entre ambos parámetros, en ganado bovino (Akthar y Mirza, 1995).

Las búfalas infectadas eliminan *Brucella* durante el aborto, convirtiéndose en fuente de infección para otros búfalos, y se ha comprobado la transmisión por ingestión de *B. abortus* virulentas en esta especie (Mohan, 1968).

La concentración de muchos animales en un área pequeña facilita la transmisión de la enfermedad y la congregación de búfalos en pantanos puede ser un importante factor de diseminación de la enfermedad (Polding, 1947 citado por Mohan, 1968).

Borriello *et al.* (2006) y Capparelli *et al.* (2007) han estudiado la resistencia genética a la enfermedad en la especie bubalina, asociada a determinado genotipo para el locus del gen *Nramp1*, el cual está implicado en la resistencia a adquisición de infecciones con bacterias intracelulares como *Brucella* en diversas especies hospedadoras. *Nramp1* pertenece a una amplia familia de genes que codifican proteínas transportadoras de iones metálicos, como el hierro. Se propuso que el mecanismo por el cual confiere inmunidad estaría relacionado con una limitada reproducción microbiana intracelular en el fagosoma de la célula gracias a la sustracción de nutrientes esenciales para el microbio invasor. Posteriormente, en 2008, Capparelli *et al.* describieron la asociación de otro gen con la resistencia a la infección con *Brucella* en búfalos. Se trata del gen *MLB* (“mannose binding lectin”) que codifica para una proteína que se une a los azúcares que se expresan en una gran variedad de patógenos. Una vez unida, esta proteína activa el complemento y opsoniza al agente para que sea atacado por los macrófagos (Takahasi *et al.*, 2005; Thiel *et al.*, 1997; Jack *et al.*, 2001). Los autores demostraron la actividad antibacteriana de los individuos con determinado haplotipo, además de la asociación estadística del tipo genético resistente dentro de las poblaciones sanas y del susceptible entre los individuos seropositivos (Capparelli *et al.*, 2008).

Es destacable que, aún en rodeos bubalinos con alta prevalencia de brucelosis, ciertos individuos permanecen negativos a los tests y presumiblemente no infectados a lo largo del tiempo, lo que indicaría que estos animales resisten la infección (Capparelli *et al.*, 2007 y 2008).

Esta resistencia genética natural, además del comportamiento y las condiciones de manejo afectan la diseminación de la enfermedad en las poblaciones (Fosgate *et al.*, 2011).

Como dificultades para controlar la enfermedad en búfalos se citan las infecciones latentes, los períodos de incubación prolongados, la incompleta protección provista por las vacunas y las dificultades para distinguir serológicamente entre los animales vacunados y los infectados naturalmente (Borriello *et al.*, 2006).

Numerosos autores han investigado distintos aspectos de la enfermedad en la especie bubalina, como la respuesta celular y humoral, la eficacia de tests diagnósticos y la identificación del agente mediante diversas técnicas, en muchos países del mundo, como India (Alam, 1996), Italia (Caporale, 2010), Trinidad y Tobago (Fosgate, 2002), Estados Unidos (Nicoletti, 1992) y Brasil (Megid, 2005). En Argentina, Draghi *et al.* (2000) describieron el hallazgo de *B. abortus* aislada a partir de un feto de búfalo (*B. bubalis*) que había sido abortado.

1.4.3.4. Epidemiología

Dada la situación de convivencia del ganado bubalino con el bovino en Argentina y los escasos datos existentes sobre la enfermedad en búfalos en el país, se tomará como base la descripción de la epidemiología en bovinos.

La prevalencia de brucelosis bovina en Argentina varía según las regiones geográficas. Encuestas serológicas realizadas en 1951 indicaban que la infección estaba presente en casi todas las provincias, con niveles que oscilaban entre el 11,1 y 17,7 (García-Carrillo, 1990). Walsh y Gimeno en la década de 1980 estimaban una prevalencia global del 20% para el ganado de carne y 25% para el ganado de leche. Los niveles más bajos de brucelosis se encontraron en las regiones de Patagonia y Cuyo, mientras que los más altos se registraron en la cuenca lechera central del país. Basándose en estudios parciales, en la década de 1990 se ha reportado una prevalencia de alrededor de 10 a 13% de rodeos infectados, con una tasa individual de 4 a 5%. En 1998 la industria lechera argentina adoptó la modalidad de ofrecer mejores precios a aquellos productores cuya leche proviniera de rodeos libres de la enfermedad, induciendo a la incorporación de mejoras en el manejo y a la disminución de las prevalencias en este tipo de ganado. Actualmente la prevalencia en rodeos bovinos lecheros se estima alrededor de 2-2,5%, mientras que en rodeos de carne es de entre 2 y 6% (Samartino, 2002).

En cuanto a la especie bubalina, la enfermedad está presente en búfalos de todo el mundo. En India ha sido reportada una incidencia de 3-5%, en Egipto 20 a 25% y en Italia más del 3% de los animales testeados resultaron infectados. Venezuela es el país americano donde el incremento de la incidencia se dio más rápidamente en búfalos que en bovinos, reportándose el 57% de los rodeos infectados (Borghese y Mazzi, 2005). En Argentina la información sobre prevalencia de brucelosis bubalina es limitada, sin embargo algunos reportes citan una positividad de 2,6% en la provincia de Corrientes (Benítez *et al.*, 2006).

1.4.3.5. Transmisión entre especies

Si bien el género se caracteriza por su elevada especificidad de especie, es evidente la habilidad de las diferentes especies de *Brucella* para infectar múltiples hospedadores.

A modo de ejemplo, la enfermedad causada por *B. melitensis* en bovinos es un problema emergente en varios países del sur de Europa (Verger *et al.*, 1989) y Asia menor, y una de sus particularidades es que la vacuna utilizada en el ganado bovino contra *B. abortus* no protege efectivamente contra la infección de *B. melitensis* (Corbel *et al.*, 1997). También constituye un problema, sobre todo en Brasil y Colombia, la infección de ganado bovino con *B. suis*. Tanto, que

en algunos lugares las vacas son la mayor fuente de infección con esta especie de *Brucella* para el humano (García Carrillo, 1990).

Los búfalos son receptivos y tienen grandes posibilidades de infectarse con cepas de *Brucella* provenientes de otras especies – como bovinos, caprinos y ovinos – con las cuales convivan. Los biotipos de *B. abortus* aislados en búfalos son el 1, 3 y en menor medida 7, y también los biotipos 1 y 2 de *B. melitensis* (Borghese y Mazzi, 2005).

1.4.3.6. Patogenia

La patogenia de la brucelosis ha sido estudiada para diferentes especies de *Brucella* en modelos murinos y por estudios de inoculación experimental con cepas vacunales y virulentas en sus hospedadores naturales. A los efectos prácticos, el curso de la infección puede dividirse en tres fases, distinguibles desde los aspectos bacteriológicos, clínicos y patológicos (Plommet *et al.*, 1982 y 1988). Estas fases son a) el inicio de la infección (período de incubación) que se define como el tiempo que transcurre desde que *Brucella* ha invadido al hospedador hasta el momento de la aparición de los primeros síntomas; b) la fase aguda, que sucede cuando la bacteria replica activamente en los distintos órganos de los sistemas reproductivo y reticuloendotelial y los síntomas clínicos y patológicos se evidencian y c) la fase crónica, que se caracteriza por una fuerte reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, síntomas clínicos intermitentes y signos patológicos conspicuos en distintos órganos. En modelos murinos, los tiempos de cada una de estas fases son: 2 a 3 días para la primera, 2 o 3 semanas para la fase aguda y 6 meses a 1 año o más para el periodo crónico (Martirosyan *et al.*, 2011). En sus hospedadores naturales la inoculación experimental con bacterias virulentas en primera instancia induce una colonización de los nódulos linfáticos regionales cercanos al sitio de ingreso para luego la bacteria distribuirse a través del sistema reticuloendotelial, tal como se demostró en trabajos realizados en ovinos con *B. melitensis* (Muñoz *et al.*, 2008). En hembras preñadas, el agente invade la placenta ocasionando la necrosis de los trofoblastos y la ulceración de las membranas corioalantoideas, causas del típico aborto del feto en el último tercio de la gestación (Anderson *et al.*, 1986a, 1986b; Tobias *et al.*, 1993). Si la hembra no está preñada permanecerá como asintomática, pero eliminará cantidades variables de patógenos a través de las secreciones, pudiendo contagiar a otros animales del rodeo de esta manera (Capparelli *et al.*, 2009). La orquitis y epididimitis crónicas de los machos infectados se debe a la replicación de *Brucella* en testículos y glándulas anexas (Chand *et al.*, 2002).

1.4.3.7. Respuesta inmune

De la gran variedad de antígenos presentes en *Brucella*, los mejor caracterizados son los provenientes del lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMPs), los cuales se han analizado desde el punto de vista del diagnóstico y la inmunoprofilaxis (Estein, 2006).

La respuesta inmunitaria contra *Brucella* ha sido ampliamente estudiada. Es sabido que la inmunidad humoral puede otorgar alguna protección en las etapas iniciales de la enfermedad pero la acción bactericida se debe a la inmunidad mediada por células en colaboración con los anticuerpos (Araya y Winter, 1990).

1.4.3.7.1. Respuesta humoral

Utilizando como modelo lo que ocurre en bovinos tras la exposición a *B. abortus* (por ser lo que más detalladamente ha sido estudiado), la secuencia de aparición de las inmunoglobulinas (Ig) sería la siguiente: tempranamente, hay una respuesta del isotipo IgM, cuya intensidad depende de la ruta de exposición, la dosis de bacteria y el status sanitario del animal. La síntesis de IgM es seguida casi inmediatamente por la producción de IgG1 y, más tarde, por pequeñas cantidades de IgG2 e IgA. La mayoría de las reacciones cruzadas, donde los anticuerpos son resultantes de la exposición a otros organismos distintos de *Brucella* spp. que contienen epitopes comunes en el LPS – por ejemplo *Yersinia* – consisten mayormente en IgM (Nielsen, 2002; Bowden *et al.*, 2007). Los tests serológicos que se basan en la medición de IgM, son, por lo tanto, poco deseables, dado que pueden ocurrir falsos positivos que disminuirán la especificidad de la prueba. Debido a que las IgG2 e IgA se generan una semana más tarde que las IgM luego de la exposición y están usualmente presentes en pequeñas e inconsistentes cantidades, por lo que la IgG1 es el isotipo más importante para el diagnóstico. Consecuentemente, los ensayos que miden IgG1 son los más usados (Nielsen, 2002).

1.4.3.7.2. Respuesta celular

La resistencia a los patógenos intracelulares se debe prioritariamente a la activación de la inmunidad mediada por células (Zhan y Cheers, 1995). Dada la capacidad de *Brucella* de vivir en el espacio intracelular de su hospedador estableciendo una infección persistente, es una bacteria que genera una potente inducción de respuestas inmunes celulares. Los linfocitos de animales infectados reaccionan precozmente contra las bacterias, lo cual se ha observado mediante estudios de blastogénesis *in vitro* (Wyckoff, 2002), determinándose respuestas más inmediatas incluso que la producción de anticuerpos séricos. Lamentablemente, la respuesta *in vitro* no se ha podido correlacionar con la protección conferida al animal (Bowden *et al.*, 2007). Las células que primero entran en contacto con *Brucella* son los polimorfonucleares neutrófilos, referentes de la inmunidad innata y en los que sobrevive y se multiplica (Enright, 1990). Éstos facilitan la diseminación de las

bacterias dado que las protegen de la acción de los anticuerpos y el complemento y a su vez las transportan hacia los tejidos linfoides y órganos del sistema reticuloendotelial, donde el agente es fagocitado por los macrófagos en los que, como se ha explicado anteriormente, esta bacteria sobrevive. Sin embargo se ha demostrado que tanto neutrófilos como macrófagos tienen la capacidad de destruir a los agentes fagocitados mediante los conocidos mecanismos de “estallido respiratorio” y producción de radicales oxígeno libres (Canning *et al.*, 1988). Se sabe que el principal activador de los macrófagos es el interferón (IFN) segregado por los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Baldwin, 1993). Varias citoquinas son liberadas por las células efectoras de la inmunidad y participan en la activación de las células NK (“natural killer”) que aunque de actividad inespecífica, colaboran con los linfocitos T en el control de la infección (Estein, 2006).

Los animales vacunados o infectados con cepas virulentas desarrollan una hipersensibilidad de tipo IV (mediada por células) cuando son inyectados con antígenos de *Brucella*, lo cual ha dado lugar al desarrollo de técnicas diagnósticas de tipo alérgico (Saegerman *et al.*, 1999). Esta respuesta da evidencias de un contacto previo con el agente, pero no está relacionada con la protección (Bowden *et al.* 2007).

1.4.3.8. Control

En Argentina está vigente desde el año 1998 un Plan Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina, basado en la vacunación con Cepa 19 de *B. abortus*, el diagnóstico serológico y la segregación y envío a faena de los positivos. En el año 2005 el plan se extendió a los búfalos bajo las mismas normas establecidas para los bovinos. Las técnicas serológicas reglamentadas incluyen las del Antígeno Bufferado en Placa (BPA) y Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto en leche como pruebas tamiz o “screening” y las de Seroaglutinación en tubo (SAT), 2-mercaptoetanol (2ME), Polarización Fluorescente (FPA) y ELISA de competición en suero como confirmatorias, mientras que la Fijación de complemento (FC) se reconoció como técnica de referencia (Nicola y Elena, 2009).

1.4.4. Del diagnóstico

1.4.4.1. Cultivo

El aislamiento bacteriológico y la tipificación del organismo causal, constituyen el único diagnóstico de certeza. Los resultados del cultivo son conclusivos y sirven de base para todos los demás métodos de diagnóstico. *B. abortus* puede ser recuperada de muestras de abomaso fetal, otros tejidos fetales como bazo y pulmón, placenta, útero, secreciones vaginales, leche o calostro, semen, ganglios linfáticos y líquido de higromas articulares (Nicoletti, 1980; OIE 2008).

En general se utilizan medios de cultivo selectivos sólidos, porque permiten el crecimiento de colonias aisladas fácilmente reconocibles y limitan el crecimiento de mutantes y de excesivos contaminantes. El empleo de los medios líquidos se recomienda para muestras voluminosas o con fines de enriquecimiento. El medio bifásico de Castañeda es específico para hemocultivos. Todos los medios selectivos incluyen distintos antibióticos para limitar el crecimiento de organismos contaminantes. Aunque se recomienda evitar el uso de animales de laboratorio, este método suele utilizarse para recuperar *Brucella* spp. de muestras muy contaminadas o cuando se sospecha que éstas contienen muy bajo número de bacterias. Para esto se utilizan cobayos o ratones de los que se obtienen muestras de suero para serología y posteriormente al sacrificio muestras de bazo para ser cultivadas en medio selectivo (OIE, 2008). Los métodos utilizados para observar la morfología de las colonias son el de Henry mediante luz reflejada oblicua, la prueba de la acriflavina de Braun y Bonestell, o el método de White y Wilson de tinción de colonias con cristal violeta (Alton *et al.*, 1988).

Luego de ser cultivados los microorganismos pueden tipificarse según género, especie, biotipo y hasta cepas, particularmente en el caso de las vacunales. Sin embargo, esta técnica diagnóstica presenta una serie de desventajas, una de ellas es el tiempo que demanda el proceso hasta lograr una identificación definitiva – usualmente 2 semanas – y las necesidades de personal altamente capacitado y laboratorios con un nivel III de bioseguridad, dada la condición zoonótica del patógeno. Otra desventaja consiste en que no siempre es posible aislar *Brucella* spp. por lo que los resultados no son siempre definitivos ya que la patogenia de la enfermedad y la inmunidad del animal infectado determinan que la presencia de la bacteria en líquidos y tejidos sea variable (Bricker, 2002)

1.4.4.2. Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico molecular, basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) aportan considerables ventajas respecto del cultivo en relación a la sensibilidad, especificidad y sencillez de la técnica (Yu y Nielsen, 2010).

PCR es una prueba molecular mediante la cual se puede detectar de manera específica y en un corto período de tiempo fragmentos del genoma del organismo a identificar, independientemente de la viabilidad de dicho organismo. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico del genoma, a través de secuencias iniciadoras de replicación (“primers”) que se unen a sus cadenas complementarias de ADN orientadas en dirección 5’ 3’. La replicación de los fragmentos de ADN ocurre en forma exponencial gracias a la enzima DNA-polimerasa en presencia de los DNTPs en condiciones físico-químicas determinadas. Este método

ha permitido identificar el género *Brucella*, diferenciar la cepa 19 de *B. abortus* de la silvestre y determinar el biovar (Fekete *et al.*, 1990, Bricker y Halling, 1995; Leal-Klevezas *et al.*, 1995a; Ewalt y Bricker, 2000; Bricker, 2002; Bricker *et al.*, 2003; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005; OIE, 2008). La habilidad para discriminar cepas, la mayoría de las veces depende del análisis de más de una secuencia a partir de cultivos bacterianos. Se ha evaluado también PCR partir de muestras clínicas como tejidos, semen, leche y sangre, aunque en estos casos suelen observarse problemas para reproducir los resultados y una menor eficiencia de la prueba (Bricker, 2002).

Como paso previo para la aplicación de este diagnóstico se requiere de la extracción de ADN a partir de la muestra, existiendo protocolos estandarizados para cada tipo de espécimen (Yu y Nielsen, 2010).

Según cuál sea el objetivo de identificación, los primers pueden utilizarse como pares únicos o de manera múltiple, en diferentes combinaciones (Yu y Nielsen, 2010). Existe una importante cantidad de reportes del uso de esta técnica y una gran variedad de genes ha sido objetivo de la amplificación para detectar *Brucella*. En la tabla II del Apéndice se resumen los genes y tipos de PCR más utilizados.

La amplificación del ADN se lleva a cabo en un termociclador, dispositivo que provee de las condiciones de temperatura necesarias para que ocurra la reacción.

La identificación se basa en la visualización de bandas según el tamaño molecular del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio y luz UV. Las bandas se comparan con las generadas por las cepas de referencia y en relación a un marcador de peso molecular. La especificidad del fragmento amplificado se evalúa con el análisis de una muestra negativa y el control de reactivos sin ADN (OIE, 2008).

Recientemente se ha desarrollado la técnica de PCR en tiempo real (Real-Time PCR o RT-PCR), que no requiere del análisis por electroforesis por lo que se evita el uso de bromuro de etidio y la contaminación derivada de la manipulación post-amplificación. Al igual que para PCR las muestras pueden provenir de cultivos de *Brucella* spp., tejidos, suero o sangre (Redkar *et al.*, 2001; Queipo-Ortuño *et al.*, 2005; Kattar *et al.*, 2007). La amplificación se lleva a cabo en tubos capilares de vidrio que ofician de cubetas donde se mide, en tiempo real, la fluorescencia emitida por los amplicones que están constituidos por moléculas de ADN unido a pigmentos. Un fluorímetro equipado con una luz de xenón excita dichos pigmentos, que fluorescen en proporción a la cantidad de amplicones (Redkar *et al.*, 2001) y dicha reacción se grafica mediante un programa de visualización. Por lo tanto, RT-PCR es la detección y medición de los productos generados en cada ciclo de PCR (Gizinger, 2002). Para diferenciar estos productos de amplificación se utiliza el

parámetro de la Temperatura de Disociación o “Melting Temperature” (T_m) que consiste en elevar la temperatura del termociclador hasta que se detecte una disminución de la fluorescencia que indica que las hebras de ADN de los productos se han separado. El gráfico resultante de las medidas de la fluorescencia durante esta disociación toma la forma de una curva. La forma y posición de esta curva dependen del radio de separación entre las bases que conforman la molécula de ADN y de la longitud y secuencia de las hebras producto de la amplificación (Ririe *et al.*, 1997).

1.4.4.3. Serología

La evaluación de los anticuerpos en suero y leche permite diagnosticar brucelosis en forma indirecta ya que evidencia el contacto del hospedador con la bacteria. Ninguno de los tests es ciento por ciento eficaz, por lo que en general es conveniente recurrir a dos o más pruebas, las de alta sensibilidad como pruebas “tamiz” o “screening” para luego confirmar sus resultados mediante técnicas caracterizadas por su elevada especificidad, sin desmedro de la sensibilidad (Nicola y Elena, 2009; Nielsen, 2002; Padilla Poester *et al.*, 2010).

Las pruebas conocidas como de unión secundaria, caracterizadas porque la unión entre el antígeno y su anticuerpo específico se hace evidente a partir de una consecuencia visible de la formación de los complejos Ag-Ac *in vitro*, como la aglutinación y la precipitación (Tizard, 1979), han sido las primeras desarrolladas para el diagnóstico de brucelosis y ampliamente utilizadas durante décadas del siglo XX, aunque algunas de ellas ya han caído en desuso. El primer diagnóstico serológico fue realizado por Wright y Smith (1897) y perdura hasta nuestros días. Un gran número de técnicas serológicas han sido desarrolladas y modificadas para incrementar su rendimiento. Se incluyen en este grupo las pruebas de aglutinación rápidas en placa comenzando por la prueba de Huddleson (Huddleson y Abell, 1929), que fue luego modificada para incrementar la especificidad a través de la inhibición de las IgM, las que suelen ser inespecíficas.

Las modificaciones se basaron en la concentración de células, el buffer y el pH del antígeno, como es el caso de las pruebas Card Test (Nicoletti, 1967), Rosa de Bengala (Morgan *et al.*, 1969) y prueba del antígeno bufferado (BPA) utilizada actualmente como prueba tamiz en diferentes países incluyendo Argentina (Angus y Barton, 1984). La prueba del Rivanol (Nicoletti, 1969, Huber y Nicoletti, 1986) también realizada en placa, ha sido usada como prueba confirmatoria porque el compuesto que contiene afecta las IgM. También se incluyen en este grupo las pruebas de aglutinación lenta en tubo (Wright), que detecta diferentes tipos de inmunoglobulinas presentes en el suero, y las modificadas con el fin de incrementar la especificidad. Es el caso de la prueba del 2-Mercaptoetanol (Rose y Roepke, 1964; Anderson *et al.*, 1964), que incluye el reactivo del mismo nombre que destruye químicamente la estructura de la IgM. La prueba de inactivación a

56°C, incluye el tratamiento de los sueros a esa temperatura para destruir las IgM, (Amerault *et al.*, 1961). La prueba de Coombs, desarrollada en 1945 (García-Carrillo, 1982) permite completar y visualizar la aglutinación del antígeno con los anticuerpos incompletos característicos de las infecciones crónicas. Aunque la OIE desaconseja el uso de las pruebas de Wright y 2ME, porque su eficiencia ha sido superada por otras, ambas técnicas todavía se utilizan para el diagnóstico de brucelosis bovina por lo que serán descritas en el capítulo II (Metodología). La prueba del anillo en leche incluye el colorante hemtoxilina unido al antígeno que permite la visualización rápida del complejo antígeno-anticuerpo unido a los glóbulos grasos. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para la vigilancia epidemiológica en rodeos lecheros de diferentes países y todavía está vigente (Hunter y Allan, 1972; Huber y Nicoletti, 1986; Sutra *et al.*, 1986).

La prueba de fijación del complemento fue desarrollada para el diagnóstico de brucelosis en diferentes especies a mediados del siglo XX y todavía se considera de referencia internacional, principalmente por su elevada especificidad y reproducibilidad de los resultados, pero su complejidad ha limitado su implementación en forma masiva. Requiere de la estandarización de todos los reactivos y de la homologación con el Suero Patrón Internacional anti-*Brucella abortus*. Ha sido la base de las campañas de erradicación de brucelosis bovina (Hill, 1963; MacKinnon, 1963; Nicola y Elena, 2009).

Los ensayos de unión primaria se caracterizan porque sus resultados se basan en medir la cantidad de complejos inmunes que se forman al confrontar el antígeno con sus anticuerpos específicos (Tizard, 1979). Se incluyen aquí las pruebas inmunoenzimáticas en fase sólida como ELISA-i utilizada tanto en suero como leche y recomendada como “screening” (Carlsson *et al.*, 1976; OIE, 2008; Nicola y Elena, 2009). Puede realizarse en diferentes formas, según el sistema de detección antígeno-anticuerpo se base en la conjugación con una enzima, generalmente la peroxidasa, de un anticuerpo secundario específico de especie policlonal (Lamb *et al.*, 1979; Herrman *et al.*, 1982) o un monoclonal (OIE Manual, 2000a) o a través de las proteínas A y/o G derivadas del *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp., respectivamente, que se caracterizan por su alta afinidad para unirse en forma inespecífica con diferentes inmunoglobulinas independientemente de la especie (Eliasson *et al.*, 1998). ELISA-i está recomendada como prueba tamiz, pero dada su mayor complejidad y costo en relación al BPA y con similar sensibilidad y especificidad difícilmente pueda llegar a reemplazarla. Esta prueba en cambio ha ido desplazando a la PAL por su mayor eficiencia para la vigilancia epidemiológica en rodeos lecheros (OIE, 2008).

ELISA de competición se aplica en muestras de suero y posee elevada especificidad por lo que ha sido recomendada como prueba confirmatoria y está recomendada para el movimiento internacional de bovinos (OIE, 2002).

La prueba de polarización fluorescente (FPA) es independiente de la especie hospedadora y puede ser aplicada en suero y leche (Nielsen *et al.*, 1996; Nielsen, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; OIE, 2008). Aunque se ha recomendado como prueba tamiz, en Argentina se ha reglamentado su aplicación como confirmatoria (SENASA, Resolución N° 438/2006). Es una técnica rápida y precisa, que puede llevarse a cabo fuera del laboratorio, es más sencilla que las anteriores, y ha sido validada para un gran número de especies, entre las que se incluye al búfalo (*Bubalus bubalis*) (Nielsen y Gall, 2001; Montagnaro *et al.*, 2008). Los pasos de la prueba, que se completan en unos pocos minutos, requieren primero de una dilución del suero en un solo paso, luego el cálculo de la fluorescencia de fondo (“background”), seguida de la adición de un antígeno marcado y, finalmente, la medición de la interacción antígeno-anticuerpo (Lucero *et al.*, 2003). El punto de corte de la técnica puede aplicarse a diferentes situaciones epidemiológicas (Montagnaro *et al.*, 2008).

1.4.4.3.1. Interferencia vacunal

Para el control de la brucelosis se ha desarrollado una gran variedad de inmunógenos. En las primeras instancias se siguieron dos líneas principales, las vacunas atenuadas vivas y las inactivadas o bacterinas (Crespo León, 1994) y en ambos casos se utilizan células enteras, siendo, por lo tanto, vacunas celulares.

El uso de bacterias vivas asegura la inducción de una respuesta inmune e incluso la reestimulación del sistema inmunitario debido a la replicación del agente dentro del organismo hospedador (Drabner y Guzman, 2001). Dentro de este grupo se desarrollaron a su vez vacunas elaboradas con cepas lisas y rugosas. Las cepas lisas utilizadas hasta el presente en la mayoría de los países en bovinos, caprinos y ovinos son *B. abortus* cepa 19 y *B. melitensis* Rev.1 (Alton y Elberg, 1967; Blasco, 1990; Nicoletti, 1990). Las cepas rugosas se caracterizan por su escasa expresión de OPS, lo que evita la formación de anticuerpos aglutinantes que interfieran con los diagnósticos serológicos. En este grupo se incluye a la cepa 45/20 de *B. abortus*, la cual resultó poco estable y con riesgo de reversión hacia formas virulentas, razón por la cual se la desarrolló luego como vacuna muerta, pese a lo cual no ha dado buenos resultados (MacKeon, 1976, Schurig *et al.*, 2002). Otra vacuna rugosa que sigue siendo ampliamente utilizada en varios países del mundo es la desarrollada con la cepa RB51 de *B. abortus* (Samartino *et al.*, 2000). Sin embargo existe disparidad de criterios en lo referente a la protección que ésta confiere en bovinos, y es de

destacar que en ovinos y caprinos esta cepa no ha demostrado conferir inmunidad (Moriyón *et al.*, 2004).

Las vacunas desarrolladas con cepas muertas – bacterinas – que fueron utilizadas durante años son las producidas con *B. melitensis* H38 (lisa), la que dio resultados similares a los obtenidos con cepa 19 de *B. abortus* y Rev.1 de *B. melitensis* y la ya mencionada cepa 45/20 *B. abortus*, que manejada de este modo resultó poco inmunógena (Renoux, 1957 y 1958, citado por Estein, 2006; Plommet, 1990).

La vacuna a la que se recurre actualmente para el control de la brucelosis en Argentina y en muchos otros países es la elaborada con cepa 19 de *B. abortus* (C19). Esta cepa es de patogenicidad reducida (Sangari *et al.*, 1994b) y protege efectivamente contra la manifestación de síntomas debido a su capacidad de producir una infección limitada en el hospedador inmunizado, que reproduce el proceso de infección natural con cepas silvestres. Entre sus desventajas se cita que C19 es serológicamente indistinguible de las cepas virulentas con las pruebas serológicas convencionales durante un período variable después de la vacunación, lo cual ha provocado que los diagnósticos hayan sido algo confusos desde el desarrollo de esta vacuna (Nicoletti, 1990; Estein, 2006). Sin embargo dicha vacuna fue y es una importante herramienta en los programas de control y erradicación. Antes del desarrollo de los ensayos de unión primaria la distinción serológica no fue fácil. Estos problemas fueron superados con la implementación de la vacunación en animales prepúberes, lo que limita la persistencia de los anticuerpos y con el desarrollo de enzimoimmunoensayos competitivos (ELISA-c) y el ensayo de polarización fluorescente (FPA), los cuales discriminan entre anticuerpos vacunales residuales y anticuerpos generados por infección luego de los tres meses postvacunación en la mayoría de los bovinos (Nielsen, 2002; Aguirre *et al.*, 2002; Estein, 2006).

1.4.4.3.2. Serología en búfalos

Pocos reportes que evalúen críticamente los tests diagnósticos en búfalo han sido publicados. Para el diagnóstico de brucelosis se han aplicado las técnicas usadas en bovinos sin verificar su utilidad para esta especie. La precisión de los tests diagnósticos es significativa para el éxito de los programas de control o erradicación y deben ser evaluados y estandarizados específicamente para la población animal objetivo (OIE, 2008).

En Argentina todas las pruebas que se utilizan en bovinos están también aprobadas para su uso en bubalinos, según Resolución N°725/2005 de SENASA. No obstante, no se han reportado hasta el momento estudios de validación para dichas técnicas en esta especie en el país.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1. Pruebas serológicas

2.1.1. Convencionales

2.1.1.1. Fijación de Complemento

Se utilizó la técnica de FC al 50% de hemólisis y fue tomada como prueba de referencia en búfalos para las evaluaciones de las pruebas convencionales y de nueva generación reglamentadas para bovinos (OIE, 2008). En esta prueba se utilizan bacterias completas y se basa en la capacidad que tiene el complemento de fijarse a los complejos antígeno/anticuerpo (Ag/Ac) para lisar las células. La prueba incluye dos sistemas de Ag/Ac y una fuente de complemento de cobayo (C') y se realiza en dos fases. En la primera fase se incuban en paralelo el primer sistema formado por los organismos de *Brucella* (AgBr), el suero problema – con o sin anticuerpos – y el C' (AgBr/Ac/C') y el segundo, el sistema hemolítico (SH), formado por los eritrocitos ovinos al 3% y la hemolisina (Er/Hem). Si el suero fuera positivo el C' será consumido por el primer sistema (AgBr/Ac específicos/C'), por lo que en la segunda fase cuando se agregan los eritrocitos sensibilizados, no habrá C' libre para unirse al SH y que se produzca la lisis de los eritrocitos. Cuando un suero no contiene anticuerpos específicos el C' quedará libre y será utilizado por el SH produciéndose la lisis de los eritrocitos y la liberación de la hemoglobina, reacción que se puede visualizar y medir espectrofotométricamente a 540 nm. La prueba se realizó según se describe en el manual de SENASA (Nicola y Elena, 2009). Si bien las IgM son las que tienen mayor avidéz para fijar el complemento, la inactivación de los sueros a 58°C inhibe su actividad por lo que permite detectar principalmente las IgG específicas de la infección. Puede haber fenómeno de prozona, pero es contrarrestado por el número de diluciones realizadas. Tiene el inconveniente de que algunos sueros presentan actividad anticomplementaria y complican la interpretación de un resultado, aunque este fenómeno es observado cuando las muestras de suero están contaminadas, por lo que deben desecharse. Los resultados se expresaron en unidades internacionales (UI) y títulos ≥ 41 UI se consideraron positivos (Tabla I del Apéndice). A los efectos de la evaluación de las técnicas convencionales y de la validación de las técnicas de nueva generación en sueros bubalinos, se establecieron tres rangos dentro de los reaccionantes positivos a FC (41 – 83, 106 – 331 y 425 – 1323 UIFC).

2.1.1.2. Técnica del Antígeno Bufferado en Placa (BPA)

Es una técnica de aglutinación en placa que utiliza como antígeno células enteras de *B. abortus* cepa S1119.3, estabilizadas con tinción de cristal violeta y verde brillante, en un buffer de

pH 3,65. Este bajo pH impide parcialmente la aglutinación de las IgM e intensifica la aglutinación principalmente de las IgG1, de ese modo reduce las interacciones no-específicas. Es una prueba, simple rápida y económica, utilizada como prueba tamiz. Ocasionalmente puede haber reacciones de prozona, pero generalmente ocurren falsos positivos. La eficiencia del diagnóstico de brucelosis por BPA disminuye sensiblemente por la interferencia que producen los anticuerpos generados por vacunación con C19, por lo que es necesario usar métodos más específicos para confirmar un resultado positivo (Angus y Barton, 1984; Nielsen, 2002).

2.1.1.3. Seroaglutinación en Tubo o Prueba de Wright (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2ME)

Las técnicas de SAT y 2ME son pruebas de aglutinación lenta y se realizan en tubos. La prueba de SAT permite detectar la presencia de anticuerpos IgM e IgG y la del 2ME sólo permite detectar las IgG debido a que este compuesto químico reduce los puentes disulfuro de las cadenas polipeptídicas que conforman el pentámero característico de la IgM, desnaturalizándola en compuestos monovalentes, no reactivos. El título del suero se determina por la más alta dilución que causa un grado de aglutinación y se expresa en unidades internacionales (UI) que corresponden a la recíproca de esa dilución. Las pruebas se realizaron según el Manual de Procedimientos, Resolución N° 115/99 del SENASA (Nicola y Elena, 2009). Punto 1.3 del Apéndice.

Para bovinos y búfalos se analizó la eficiencia de ambas pruebas en paralelo, según el criterio de interpretación aplicado en Argentina para bovinos como método confirmatorio. Títulos $\geq 1/200$ en SAT (200UI) y/ o de $1/ 50$ (50UI) en 2ME se consideraron positivos (SENASA Resolución N° 023/07). Las pruebas se realizaron en laboratorios de Red del SENASA. Para búfalos, las pruebas de SAT y 2ME se evaluaron también en las diferentes diluciones realizadas (1:25, 1:50, 1:100 y 1:200), individualmente.

Las pruebas se realizaron en laboratorios de Red de SENASA (BPA, SAT y 2 ME en el laboratorio L087 y FC en los laboratorios L298 y L331).

2.1.2. De nueva generación

2.1.2.1. Sueros de referencia

Para las técnicas de ELISA se utilizaron un control positivo fuerte (C ++) obtenido de un bovino con infección aguda de *B. abortus* biotipo 1 y un control positivo débil (C +) obtenido de un animal con infección crónica, homologados frente a los sueros de referencia internacional para ELISA (OIE 2008). Se utilizó además un control negativo (C -) obtenido de un animal no infectado proveniente de un rodeo libre de brucelosis.

Para la técnica de FPA los controles positivos y negativos que se utilizaron fueron los provistos por el kit comercial.

2.1.2.2. Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA)

Se basa en la medición del cambio de velocidad de rotación de las moléculas en solución, mediante la intensidad de la luz polarizada en los planos vertical y horizontal. Las pequeñas moléculas rotan más rápidamente que las grandes moléculas. Las moléculas más grandes (Ac-Ag-fluorocromo) emiten mayor luz polarizada en un simple plano mientras que las pequeñas moléculas (Ag-fluorocromo) rotan más rápido y emiten luz despolarizada (Nielsen, 1998). Para el diagnóstico de la brucelosis, se emplea como antígeno un fragmento de bajo peso molecular (~ 22 kD) del lipopolisacárido liso que incluye la cadena O de la cepa 1119-3 de *B. abortus* marcado con isotiocianato de fluoresceína (Nielsen *et al.*, 1996) La prueba se realizó según se describe en el manual de procedimientos del SENASA (Nicola y Elena, 2009). Se utilizó el kit comercial del Laboratorio Biológico de Tandil (Biotandil®). Los resultados se expresaron en unidades de milipolarización (UmP). Punto 1.4 del Apéndice.

Es una prueba rápida, de alta sensibilidad y especificidad en bovinos (Nielsen, 2000). Tiene la capacidad de distinguir entre animales infectados y vacunados después de aproximadamente 2-3 meses de la vacunación (McGiven *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2002).

2.1.2.3. Enzimoimmunoensayo de Competición (ELISA-c)

En la técnica de ELISA-c, se utiliza como antígeno el LPS- *Brucella* unido a una matriz de poliestireno. Es llamada así porque los Ac anti-*Brucella* presentes en un suero positivo compiten con un anticuerpo monoclonal (M84) por un mismo epítipo del LPS. El suero bovino y el M84 se agregan en forma sucesiva respectivamente. La mayor avidéz de los anticuerpos policlonales representados por los distintos isotipos de inmunoglobulinas específicas desplazan al M84. El revelado se realiza mediante un anticuerpo anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa que en presencia del sustrato (H₂O₂) y el cromógeno (ABTS) produce una reducción del H₂O₂ con la oxidación del cromógeno que genera color y puede cuantificarse espectrofotométricamente (absorbancia) en un lector de ELISA. Una reacción negativa ocurre cuando se forma el complejo Ag/M84/Peroxidasa/Sustrato, con desarrollo de color. El valor de absorbancia será inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-*Brucella* existente en el suero incógnita (Nielsen, 1989). Se utilizó la técnica descrita en el manual de procedimientos del SENASA (Nicola y Elena, 2009). Punto 1.5 del Apéndice.

Los resultados se expresaron en porcentajes de inhibición (%I) según la siguiente fórmula:

$$\%I = 100 - (\text{DO muestra} \times 100) / \text{DO media C++}$$

Donde:

DO: densidad óptica

C++: control fuertemente positivo

El punto de corte para bovinos $\geq 40\%I$.

2.1.2.4. Enzimoimmunoensayo Indirecto (ELISA-i)

En la técnica de ELISA-i, se utiliza también como antígeno el LPS-*Brucella* unido a una matriz de poliestireno. Al agregar un suero con anticuerpos contra *Brucella* spp, se produce la reacción Ag/Ac. El sistema detector se basa en un Ac anti-IgG, conjugado con Peroxidasa que en presencia del sustrato (H₂O₂) y del cromógeno (ABTS) produce una reducción del H₂O₂ y la oxidación del cromógeno que genera color y puede cuantificarse espectrofotométricamente (absorbancia) en un lector de ELISA. El desarrollo de color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-*Brucella* (Nielsen *et al.*, 1992). La prueba se llevó a cabo según lo descrito en el manual de procedimientos del SENASA (Nicola y Elena, 2009). Punto 1.6 del Apéndice.

Se utilizaron dos variantes de ELISA-i basadas en el lipopolisacárido de *B. abortus* 1119-3, usando M23/Peróxida o proteína A/G/Peroxidasa como sistema de unión a los anticuerpos específicos del suero.

ELISA-i M23/peroxidasa se basa en un monoclonal producido en ratón, específico para IgG bovina, conjugado con una peroxidasa (Nielsen *et al.*, 2004). Esta prueba es específica de especie, por lo tanto indica el grado de compatibilidad entre las IgG de los búfalos respecto de las de los bovinos, ya que como sistema revelador recurre a un AcMc (anticuerpo monoclonal) contra la IgG bovina.

ELISA-i A/G/peroxidasa utiliza un conjugado basado en una proteína recombinante, formada por sitios de unión de la proteína A y la proteína G producidas, respectivamente, por *Staphylococcus aureus* y por *Streptococcus* spp. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse de manera no específica con inmunoglobulinas de varias especies, entre ellas el búfalo (Nielsen *et al.*, 2004).

Los resultados se expresaron en porcentajes de positividad (%P) según la siguiente fórmula:

$$\%P = \text{DO muestra} \times 100 / \text{DO media C++}$$

Donde:

DO: densidad óptica

C++: control fuertemente positivo

2.2. Técnicas moleculares

2.2.1. Extracción de ADN

Se obtuvo ADN a partir de muestras de sangre entera con anticoagulante, leche homogeneizada y los tejidos fetales y/o de animales adultos consignados previamente. Todas las muestras clínicas se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

Para la extracción del ADN se recurrió al procedimiento basado en el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Las muestras de sangre fueron tratadas con buffer lisis de glóbulos rojos, para luego ser sometidas al proceso de extracción indicado en el protocolo. Las muestras de leche fueron centrifugadas y se trabajó con el sedimento que contiene grasa y sólidos de leche, y las muestras de otros tejidos fueron previamente trituradas.

Este método dio como resultado la obtención del ADN, que luego de extraído se dejó secar en cada tubo. Para proceder al análisis por PCR y RT-PCR el ADN fue resuspendido en agua libre de DNAsas y RNAsas.

El detalle de cada protocolo de extracción según la muestra clínica analizada se consigna en el punto 2 del Apéndice.

2.2.2. Secuencias de ADN objetivo

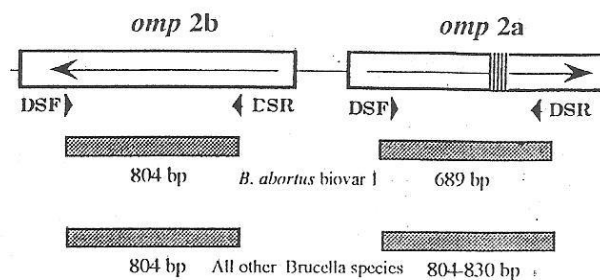
Se amplificaron por PCR secuencias de determinadas regiones del genoma de *Brucella* spp. que permiten distinguir especies y biovars (bv). Para este fin se utilizaron diferentes pares de “primers” descritos previamente para la identificación y caracterización molecular en base a los genes que codifican las proteínas de membrana externa – OMP – (genes *omp31* y *omp2ab*), el gen *eri* relacionado al metabolismo del eritritol y el gen *alk* asociado al inserto *IS711* estable en el genoma (Baily *et al.*, 1992; Bricker y Halling, 1994 y 1995, Sangari *et al.*, 1994a, Leal-Klevezas *et al.*, 1995a y Leal-Klevezas 1999, dato no publicado). Los primers utilizados en este estudio se presentan en la tabla 2. Todos ellos fueron preparados por el laboratorio Invitrogen.

2.2.2.1. Gen *omp31*. Mediante los primers B4/B5 se identificó *Brucella* spp. a través de la amplificación de un segmento de 223 pb, correspondiente al gen que codifica la proteína de membrana externa antigénica de 31 kDa, BCSP31 (Baily *et al.*, 1992).

2.2.2.2. Gen *omp2ab*. Dos juegos de primers fueron utilizados para amplificar segmentos de este gen que codifica una de las OMP de las especies de *Brucella* (Leal-Klevezas *et al.*, 1995a).

- Primers DSF/DSR2: identificaron *Brucella* spp. a través de la amplificación de un fragmento de entre 758 y 858 pb, correspondiente a una región polimórfica del gen *omp2(a y b)*
- Primers DSF/DSR: se utilizaron para amplificar fragmentos correspondientes a dos copias del gen *omp2*, presentes en *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. canis* y *B. ovis* y sus biovars. El fragmento esperado fue de 804 pb, excepto en el bv1 de *B. abortus*, en cuyo caso una de las copias del gen presenta una delección de 115 pb, siendo entonces dos los fragmentos esperados, uno de 804 pb y otro de 689 pb correspondiente a la copia del gen con la delección (Figura 5).

Figura 5. Esquema del locus *omp2ab* de *Brucella* spp.



Las flechas indican la orientación de ambos genes (*omp2a* y *omp2b*). Los triángulos representan la posición de los primers DSF y DSR. Los rectángulos sombreados representan los fragmentos amplificados de 804-830 pb (excepto *B. abortus* bv1, donde el tamaño de uno de los fragmentos es de 689 pb). Las líneas verticales representan la región deletada en *B. abortus* bv1. Fuente: Leal-Klevezas *et al.*, 1995a.

2.2.2.3. Gen *eri*. Este gen regula la capacidad *B. abortus* para metabolizar el eritritiol.

La cepa vacunal *B. abortus* C19 presenta en este gen una delección de 702 pb (Sangari y Agüero, 1994b). Por lo tanto utilizando los primers *Eri1-Oligo2* los fragmentos esperados fueron de 1000 pb para el caso de *Brucella* spp. y de 297 pb para *B. abortus* cepa 19. Figura 6.

Figura 6. Secuencia de nucleótidos de parte de la región *eri* del cromosoma de *B. abortus* 2308.

```

BallI 100
TGGCCATCCCGACCCGGGACGTGCGCCGCTATTATGTGGA CTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTATCGCGGATCTTGGCGGCAAGTCCGTCACGCAG
200
TTTGCAATCTTCACCTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCCCGGAAGAACTTATCAAGATCGCCATCGCATGCTGGGCCGAGGTGGCCGAACATCGCC
300
CAGGTGCGGGCCTCGACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCCGAAATTTGGCGAGACGATTGCCGAATGCATGAAGCTTCAGGATCGGCTCAC
HindIII
CGCCGCTAAACATGGCCATCGCCATGTGGATGATGGCCGATATCGACCATGGTGACGTGACATCCGCTAACCCGGACGACTACGATCCTTACGCATGGGGC
400
CGCACCGTGGCGAAAGTCTCGCCCATCATCCATATCAAGCAAAGCCTGATGGACAAGGGCGGGCATCGTCTTTTCACAGCCCGTTCAAATGCCAAGGGCC
500
GCATCCAGCCGGAAACCGCTTTTGAAAGCCTTTGCCGACGGCGGGTGGATAATGAAATCTGTCTTGAAC TTTGTTCAAGGACGCGAGCCGAACGACCG
600
TGAAAGTCATTCCACAGATTGCAGAAAGTGTGGCTTTCTGGCGCCGCACATTGACACCGCGCTAAGGACTTGAAGATATAGGAAATTTCCAGAACCGGA
700
CGCGTTCAAATGGCAGATGCAGACGATCTCTGGCGCTTCGGCGCCCTGGCTTCATTTCTGTCGCCGGCATGACTCAGTCTGCCGTTGCCAAGCGCCTTG
800
GCCTGCCTTCGGTGAAAGCGCATCGTCTCATCGCCAAGCCGTTGCCGACGGCGGGTAAAAGTGACCATCGACGGTGACATCACCGAATGCATCGATCT
ClaI 900
GGAAAAACCGTCTGGCCGATCTTTACGGCCTCGATTATTGCGAGGTGCGCACCGAATTTGGCGAGGAAAGGCTGCGCGTGCATGGCCATGGCCATGCGGGC
BallI 1000
GCGAATTTATGCGCCGCGAAATCGAACATGGCGATCATGAGGTGATCGGCATCGGCCATGGCCGACACTTTTCGGCAGCGGTTGGTTATATGCGCGCTG
1100
TCATGGCCAAATGATCTGCGTTCTGCTCTCGCTTCTGGCGCCCTCACGGCAAATTTGCGCCCAACCCGATGACGTGATGCACCGCATCGCGGAAAAAAC
1200
CGGAATGCCCGCTTATGTGATGCCGGTGCCCTTCTTCGCCAATACGGCGGAAGACCGCGAAGTGCTGCTGG

```

La secuencia del cromosoma de *B. abortus* C19 es la comprendida entre los sitios donde se indican los marcadores denominados *Ball*. La delección en dicha secuencia está compuesta por 702 pb entre las posiciones 263 y 964. Los rectángulos marcan la posición de dos repeticiones probablemente implicadas en la génesis de dicha delección. Los oligonucleótidos elegidos como primers para PCR están subrayados. Dichas secuencias están depositadas en las bases de datos de GenBank bajo los números de acceso X78881 (*B. abortus* 2308) y X78882 (*B. abortus* cepa 19). Fuente: Sangari y Agüero, 1994.

2.2.2.4. Gen *alkB*-Inserto *IS711*. El gen *alkB* codifica una enzima reparadora de ADN.

El inserto *IS711* es una secuencia repetitiva de inserción estable dentro del genoma de *Brucella*, cuyo número y localización es variable dependiendo de la especie. Una copia del *IS711* se halla contigua a dicho gen en *Brucella* spp. y existe diversidad genética entre variedades a este respecto (Marianelli *et al.*, 2003). Basados en esta diversidad Bricker y Halling (1994) desarrollaron una PCR múltiple conocida como AMOS PCR que permite identificar los biovars 1, 2 y 4 de *B. abortus*, *B. melitensis* bv1, bv2 y bv3; *B. ovis* y *B. suis* bv1. Con el objeto de incrementar la sensibilidad, para este trabajo se realizaron pruebas independientes utilizando los primers 416F/*IS711*R y *B. melitensis*F/*IS711*R

para amplificar un fragmento de 498 pb para *B. abortus* y de 731 pb para *B. melitensis* respectivamente. Los fragmentos esperados con los primers *IS711-alkB* para cada especie y biovar de *Brucella* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. AMOS-PCR Fragmentos esperados para las diferentes especies y biovares de *Brucella*.

<i>Brucella spp.</i>	AMOS/ IS711 PCR
<i>B. abortus</i> bv. 1	498
<i>B. abortus</i> bv. 2	498
<i>B. abortus</i> bv. 3	np
<i>B. abortus</i> bv. 4	498
<i>B. abortus</i> bv. 5	np
<i>B. abortus</i> bv. 6	np
<i>B. abortus</i> bv. 7	np
<i>B. abortus</i> bv. 9	np
<i>B. melitensis</i> bv. 1	731
<i>B. melitensis</i> bv. 2	731
<i>B. melitensis</i> bv. 3	731
<i>B. ovis</i>	976
<i>B. suis</i> bv. 1	285

*np: sin producto

Fuente: adaptado de Biancifiori, 1998.

Para la identificación de *B. abortus* biovares 3, 5, 6 y 9 se utilizó otra secuencia del *alkB*, (*alkB1*) que genera un fragmento de 1700 pb (Ocampo-Sosa *et al.*, 2005).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos (“primers”) utilizados en las pruebas de PCR y PCR en tiempo real.

Primers	Secuencia (5'-3')	Región genómica	Especificidad	Secuencia amplificada (pb)	Fuente
B4 F	TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA	<i>Omp31</i>	<i>Brucella</i> spp.	223	Baily <i>et al.</i> , 1992
B5 R	CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG				
DSF	GCG CTC AGG CTG CCG ACG CAA	<i>omp2</i>	<i>Brucella</i> spp.	758-858	Leal Klevezas <i>et al</i> 1995a ; 1999 no publicado
DSR2	TTG CCT TTT CGG GGG CAA TGA				
DSF	GCG CTC AGG CTG CCG ACG CAA	<i>omp2</i>	<i>B. abortus</i> bv1	689 y 804	Leal Klevezas <i>et al.</i> , 1995a
DSR	ACC CCA GAC AGC CCA A		<i>Brucella</i> spp.	800 ó 830	
<i>IS711R</i>	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	<i>IS711-alkB</i>	<i>B. abortus</i>	498	Bricker y Halling, 1994
416 F	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT				
<i>IS711 R</i>	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	<i>IS711/alkB</i>	<i>B. melitensis</i>	731	Bricker y Halling, 1994
<i>B.melitensis F</i>	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA				
<i>eri 1 F</i>	GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA	<i>eri</i>	<i>Brucella</i> spp.	1000	Bricker <i>et al</i> 1995
<i>OLIGO 2 R</i>	CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA		<i>B. abortus</i> S19	297	Sangari y Agüero, 1994a
<i>IS711R</i>	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	<i>IS711/alkB1</i>	<i>B. abortus</i> bv3, bv5, bv6, bv9	1700pb	Ocampo-Sosa <i>et al.</i> , 2005
DEL569	GCG CAG CGT TGC GGC AAT TG				

F = forward, R= Reverse

2.2.3. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 50 µl. La Mezcla de PCR incluyó buffer 1X (20 mM Tris-HCl pH 0.84 y 50 mM KCl) y una concentración final de 2.2 mM de MgCl₂, 2 mM dNTP y 0.001 nM de cada primer, 5 µl de ADN y agua destilada libre de DNAsas y RNAsas. Para incrementar la especificidad de la prueba la amplificación se llevó a cabo con la modalidad Touch Down 64°C, donde la temperatura de hibridación va descendiendo 1°C en los primeros 4 ciclos, antes de realizar los 35 ciclos a la temperatura de hibridación establecida. Se utilizó un termociclador Techne TC-412. Las condiciones de la PCR se exponen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la realización de Touch Down PCR. Temperatura y tiempo para la desnaturalización (D), hibridación (H) y extensión (E) del ADN.

Período	Temperatura	Tiempo	Objetivo
Iniciación	95°C	5 min	D
Ciclos (n°)			
	95°C	1 min	D
1	68°C	1 min	H
	72°C	1 min	E
	95°C	1 min	D
1	67°C	1 min	H
	72°C	1 min	E
	95°C	1 min	D
1	66°C	1 min	H
	72°C	1 min	E
	95°C	1 min	D
1	65°C	1 min	H
	72°C	1 min	E
	95°C	1 min	D
35	64°C	1 min	H
	72°C	1 min	E
Finalización	72°	8 min	E
Mantenimiento	4°C	∞	

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0.01M de bromuro de etidio y se visualizaron a través de luz UV. Se utilizó un captador de imágenes que permite fotografiar y archivar los resultados (G-box SYNGEN®).

2.2.4. RT-PCR (PCR en tiempo real)

La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 10 µl, en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen®) 5-Plex HRM. Se utilizaron reactivos comerciales (Byodynamics®), que contienen concentraciones optimizadas de Taq polimerasa, DNTPs y el fluorocromo Eva green en un buffer de PCR (mezcla real). Para cada reacción se incluyó 5 µl de la mezcla real, 0,5 µl de cada

primer (0,002 nM) y 2µl de ADN y agua destilada libre de DNAsas y RNAsas. El termociclador se programó en la modalidad Touch Down según se describió para PCR convencional y se utilizaron los mismos primers. Se analizó la Fluorescencia emitida (%) y la temperatura de disociación (T_m) de los productos amplificados, en relación con las muestras de referencia analizadas.

Interpretación de los resultados: una fluorescencia $\geq 10\%$ y una T_m igual a la de la cepa de referencia $\pm 0.5^\circ\text{C}$ fue considerada específica para *Brucella* spp., *B. abortus*, *B. abortus* silvestre y *B. abortus* cepa 19.

2.2.5. Clonación

En determinados casos fue necesario recurrir a la clonación molecular de los fragmentos amplificados por PCR para su posterior secuenciación.

Como vector de secuenciación se utilizó el plásmido pGEM®-T Easy (Promega), el que se utilizó para transformar *E. coli* Top10F' (Invitrogen®). El medio de cultivo se basó en 1.5% agar (Gibco) LB/ampicilina/IPTG/X-Gal donde **LB** es el medio de cultivo base específico para *E. coli* (Luria Broth) **IPTG** (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) es el inductor del gen *LacZ* para la expresión de la β -galactosidasa y el X-GAL es un compuesto usado como indicador de aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa. En presencia de la enzima, el X-Gal es hidrolizado a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, el cual es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Las colonias azules indican la presencia de ese compuesto en la bacteria, mientras que las colonias blancas indican el clonado exitoso del vector ya que el fragmento clonado interrumpe la secuencia codificante para la B- galactosidasa.

Se procedió siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante del kit del vector Promega® (Promega, 2010).

2.2.6. Secuenciación

Tanto los productos amplificados por PCR como los productos clonados fueron purificados mediante un kit comercial (Qiagen®) y se enviaron a secuenciar (Macrogen, Corea). El análisis de las secuencias se realizó mediante Clustal W (Bioedit®). Las secuencias obtenidas de las cepas de referencia y de las muestras biológicas de bovinos y búfalos se compararon a través del programa Bioedit® (Hall, 1999) con las secuencias de referencia correspondientes a los bv1 (cepas 2308 y C19) y bv5 de *B. abortus* y al bv1 de *B. melitensis* depositadas en el GenBank (accesos GenBank CP000887.1, 000888.1, AM040264.1, AM040265.1, U26440.1, U26438.1, X78881.1).

2.3. Cultivo bacteriológico

Se utilizó el medio selectivo para *Brucella* spp. recomendado por la OIE (2008) basado en agar-triptosa base con el 1% de dextrosa, el 5% de suero equino inactivado y la adición de 100 mg de cicloheximida, 2500 UI de bacitracina, 6000 UI de polimixina B, 10 mg de ácido nalidíxico y 10 mg de vancomicina por cada litro de medio. Alternativamente se utilizó para el cultivo de *Brucella* spp. el medio de Skirrow (Draghi *et al.*, 2000). Los cultivos se incubaron en una atmósfera con 10 % de CO₂ a 37°C. Las colonias se observaron entre el cuarto y decimoquinto días. Las colonias sospechosas se sometieron a la coloración de Gram y se observaron con microscopio óptico con un aumento de 100 x.

2.4. Identificación y tipificación

Cualquier colonia con una morfología similar a la de *Brucella* se analizó por la tinción de Gram. La identificación de los microorganismos Gram negativos se realizó a través de la morfología celular, propiedades de crecimiento y pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa. Para completar la filiación de especies y de biovariedades se recurrió a la aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A, anti-M ó anti-R (Alton *et al.*, 1988). Los cultivos fueron realizados en los laboratorios de las EEA INTA Rafaela y Mercedes. Las pruebas bioquímicas, además de PCR y RT-PCR fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Inmunología de la EEA INTA Rafaela y la aglutinación con sueros específicos se realizó en el SENASA (Laboratorio de referencia de OIE). La cepa obtenida fue liofilizada y enviada al laboratorio de referencia de OIE (National & OIE/FAO Animal Brucellosis Reference Lab. - Bacterial Zoonoses Unit) con sede en Francia para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Los resultados se interpretaron según recomendación de OIE (2008) como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Características diferenciales de especies y biovars de *Brucella*.

Especies	Biotipo	Requiere CO ₂	Producción de H ₂ S	Crecimiento con colorantes ^a		Aglutinación con sueros monoespecíficos		
				Tionina	Fucsina básica	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^b	+	-	+	+	-	-
	2	+ ^b	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^b	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^b	+	-	+ ^c	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+ o -	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- ^e	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- ^f	+	+	-
	5	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	- ^g	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+	- ^f	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	- ^f	-	-	+

Referencias:

a Concentración del colorante en medio de dextrosa con suero: 20 µg/ml

b Normalmente positivo en aislamiento primario

c Se han aislado algunas cepas sensibles a la fucsina básica

d Algunas cepas se inhiben con colorantes

e Se han aislado algunas cepas resistentes a la fucsina básica

f Negativo en la mayoría de las cepas

g Crecimiento a una concentración de 10 µg/ml de tionina. Fuente: OIE, 2008.

2.5. Cepas de *Brucella*

B. abortus RN1 biovar 1 de bovino: aislada en INTA EEA Rafaela de un feto abortado por una vaca de raza Holando Argentino en Noethinger, Córdoba.

B. melitensis biovar 1: aislada en INTA EEA Rafaela a partir de una muestra de leche de una cabra positiva de Formosa enviada por el Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias de Formosa CEDIVEF.

B. suis biovar 1: aislada en INTA Rafaela a partir del producto de un aborto en una cerda de una piara infectada, de la provincia de Santa Fe.

Brucella spp. de búfalo: aislada en INTA EEA Mercedes Corrientes a partir de un feto bubalino abortado en departamento Formosa, provincia de Formosa.

2.6. Técnicas serológicas en búfalos

2.6.4. Evaluación de las técnicas convencionales en búfalos

Para este estudio se obtuvieron 516 muestras de sangre de búfalos provenientes de 9 establecimientos de la provincia de Corrientes (tabla 5). Todos los sueros se procesaron por la técnica de FC para diferenciar la población positiva de la negativa. Paralelamente los sueros se analizaron mediante las técnicas de BPA como tamiz y SAT/2ME como confirmatorias. Estas técnicas se evaluaron en las diluciones 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, individualmente y combinadas. Se analizó también la eficiencia de ambas pruebas, según el criterio de interpretación aplicado en Argentina para bovinos donde títulos $\geq 1/200$ en SAT (200UI) y/o de 1/50 (50UI) en 2ME se consideran positivos (SENASA Resolución N°023/07). BPA y SAT/2ME se realizaron según el Manual de Procedimientos, Resolución N° 115/99 del SENASA en el laboratorio de red SENASA L087.

2.6.5. Validación de las pruebas serológicas de nueva generación en búfalos

Se fundamenta la validación de las pruebas serológicas en el ganado bubalino, en la recomendación de la OIE (2008) que indica que las técnicas diagnósticas serológicas pueden ser utilizadas en especies diferentes a la bovina, como los búfalos entre otros, pero cada una debe ser validada para la especie de animal objetivo.

Para la validación de las técnicas de nueva generación se utilizaron 862 muestras de sueros bubalinos, de los cuales 788 sueros correspondieron a 11 establecimientos de Corrientes (n=561) y 2 de Formosa (n= 227) en donde se realizó el estudio transversal que se mencionará más adelante y 74 sueros bubalinos provenientes de la provincia de Formosa fueron cedidos por el Laboratorio de Inmunología de INTA EEA Rafaela, Santa Fe (tabla 6). Los sueros fueron analizados por FC. Fueron incluidos en la **población negativa** búfalos de rodeos donde no se detectaron positivos a FC

y en la **población positiva** aquellos bubalinos con títulos superiores a 41 UIFC, provenientes de rodeos con más de un animal positivo. Todas las técnicas de nueva generación fueron realizadas en el laboratorio de red SENASA L331. Todos los sueros fueron procesados mediante FPA, ELISA-c y ELISA-i utilizando el anticuerpo monoclonal M23 o proteína A/G, conjugados con peroxidasa, según se describió anteriormente.

2.6.5.1. Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados estadísticamente por medio del Análisis de Datos Categóricos con tablas de doble entrada.

La eficiencia de las pruebas se determinó mediante análisis del Receiver Operator Characteristic - ROC (Metz, 1978) utilizando el programa MedCalc (Shoonjans, 2005), que genera gráficos de curvas que delimitan un área para cada diagnóstico evaluado. El mayor valor de área determina un mejor rendimiento de la técnica. Mediante este análisis se obtiene un gráfico de puntos que indica la distribución de los resultados que se hallan por encima y por debajo del punto de corte, señalando la capacidad de discriminación de cada prueba. Permite además seleccionar el punto de corte óptimo donde se maximizan los valores de *Se* y *Es* o modificar los mismos en función de las necesidades de cada situación epidemiológica particular y comparar los valores bajo la curva (AUC: “area under the curve”) de distintos tests como medida de rendimiento general (Zweig y Campbell, 1993).

Se determinó la concordancia o conformidad entre técnicas diagnósticas en relación a FC y se midió el acuerdo no debido al azar (Tarabla 2000) a través del índice *kappa* de Cohen (Norman y Streiner, 2000), utilizando el programa WinEpiscope.

A partir de la fórmula *Kappa* se establecieron los niveles de concordancia:

- *Kappa* 0: No existe concordancia.
- *Kappa* entre 0,4-0,5: Concordancia moderada.
- *Kappa* entre 0,5-0,6: Concordancia aceptable.
- *Kappa* entre 0,6-0,8: Concordancia buena.
- *Kappa* superior a 0,8: Concordancia muy buena.
- *Kappa* 1: Concordancia perfecta

Fórmula kappa

$$Kappa: \frac{\frac{a + b}{N} - \frac{Ea + Eb}{N}}{1 - \left(\frac{Ea + Eb}{N} \right)}$$

Donde

a y b son los valores observados

Ea y Eb son los valores esperados

N es el número de observaciones

Utilizando el programa InfoStat se realizó el análisis de Regresión lineal obteniéndose el valor R^2 y se calculó el Coeficiente de Correlación entre los valores de las técnicas de ELISA y FPA.

2.7. Estudios epidemiológicos

2.7.1. Ecosistemas

Se trabajó en tres áreas fitogeográficas del NEA, en el dominio Amazónico Paranaense y en los dominios Chaqueños del Chaco Espinal y del Chaco Oriental.

En la tabla 5 se consignan el origen y cantidad de sueros utilizados en la evaluación de las técnicas convencionales (establecimientos E1 a E9) y en la validación de las técnicas de nueva generación (total de muestras), además de la correspondiente zona agroecológica a la que cada rodeo pertenece.

Tabla 5. Ubicación geográfica del origen y cantidad de sueros bubalinos utilizados para la evaluación y validación de las técnicas serológicas.

Establecimiento	n	Departamento	Provincia	Región fitogeográfica
E1	16	General Paz	Corrientes	Amazónica paranaense
E2	19	Itatí	Corrientes	Amazónica paranaense
E3	45	Itatí	Corrientes	Amazónica paranaense
E4	43	Itatí	Corrientes	Amazónica paranaense
E5	8	Capital	Corrientes	Chaco oriental
E6	15	General Paz	Corrientes	Amazónica paranaense
E7	150	Empedrado	Corrientes	Chaco oriental
E8	125	General Paz	Corrientes	Amazónica paranaense
E9	95	General Paz	Corrientes	Amazónica paranaense
B35	26	Formosa	Formosa	Chaco oriental
E10	12	Esquina	Corrientes	Chaco espinal
E11	33	Esquina	Corrientes	Chaco espinal
E12	142	Patiño	Formosa	Chaco oriental
E13	85	Patiño	Formosa	Chaco oriental
B95	11	Pirané	Formosa	Chaco oriental
B27	37	Laishí	Formosa	Chaco oriental
Total	862			

2.7.2. Tipos de explotación ganadera

En todas las áreas donde se trabajó el tipo de explotación es predominantemente extensivo, tanto para el ganado bovino como para el bubalino. Ambas especies convivían en los establecimientos, destinándose generalmente los campos bajos para los bubalinos y algunas categorías bovinas. Las razas bubalinas explotadas en la región eran principalmente cruza de Mediterráneo y Murrah.

2.7.3. Epidemiología comparativa en bovinos y bubalinos

2.7.3.1. Epidemiología basada en estudios serológicos

2.7.3.1.1. Encuesta serológica a partir de datos de Laboratorios de RED SENASA

Se realizó una encuesta epidemiológica basada en datos obtenidos en los laboratorios de red de SENASA L087 con sede en Corrientes, donde se utilizaron las técnicas de BPA, SAT y 2ME y el L298 con sede en Formosa, donde se utilizaron las técnicas de BPA y FC. Se analizaron los resultados positivos a brucelosis durante los años 2008, 2009, 2010 y primer semestre de 2011, en bubalinos y bovinos de las provincias de Corrientes y Formosa. De Corrientes se obtuvo información de 8 rodeos bubalinos con 416 muestras de sueros analizadas y 91 establecimientos

bovinos con 27.974 muestras analizadas. En Formosa se obtuvo información de 17 establecimientos bubalinos con 3.793 muestras analizadas, y 36 establecimientos bovinos con 18.657 muestras analizadas.

Para el análisis del porcentaje de positivos fueron descartados aquellos muestreos donde la cantidad de sueros no superó las 10 muestras. Se sumaron los muestreos de un mismo establecimiento a lo largo del año y luego los muestreos de cada establecimiento en el transcurso de los tres años y medio. Se agruparon los establecimientos por departamento en ambas provincias. Se estimó el porcentaje de positivos. Para la estimación de la evolución de la cantidad de positivos se analizaron los datos de cantidad de muestras y proporción de positivos discriminados por provincia y por año.

2.7.3.1.2. Estudio serológico transversal en rodeos bubalinos

2.7.3.1.2.1. Diseño experimental

2.7.3.1.2.1.1. Rodeos bubalinos

Los rodeos fueron seleccionados según disponibilidad y accesibilidad. Las explotaciones, en su mayor parte, fueron producciones mixtas bovinos/bubalinos, de las provincias de Corrientes (11 establecimientos) y Formosa (2 establecimientos). La ubicación geográfica de dichos rodeos se visualiza en la figura 18 de la sección Resultados. Las categorías de las que se tomaron muestras fueron hembras de entre 2 y 15 años y machos enteros de entre 3 y 8 años. En algunos de los rodeos había referencias previas de reactores positivos a serología según las técnicas de SAT y 2ME, utilizando los mismos criterios de interpretación que para bovinos.

Dada la gran variación que hay en el tamaño de los rodeos de búfalos, se estratificaron los rodeos de acuerdo con el número de animales y se los clasificó en menores de 50, de entre 50 y 500 animales y mayores de 500 animales. En la tabla 6 se expone el tamaño de la muestra obtenida en cada estrato.

Tabla 6. Cantidad de muestras bubalinas obtenidas según el tamaño del rodeo.

Tamaño del rodeo	Cantidad de muestras	Población objetivo
< 50 animales	100 % del rodeo	Hembras de 2 a 15 años. Machos > 1 año
De 50 a 500 animales	20 % del rodeo*	Hembras de 2 a 15 años
> 500 animales	Como mínimo 100	Hembras de 2 a 15 años

* Valor tomado arbitrariamente por no disponerse de datos epidemiológicos previos.

2.7.3.1.2.1.2. Muestras

Se tomaron en este estudio 788 muestras de sangre entera, sin anticoagulante, para la obtención de suero con el objeto de someterlo a las distintas técnicas diagnósticas, y sangre con anticoagulante, que fue utilizada posteriormente para los diagnósticos moleculares.

2.7.3.1.2.1.3. Análisis de datos

Se determinó la prevalencia en rodeos positivos a brucelosis según las distintas técnicas serológicas y la proporción de establecimientos positivos. Se evaluó la prevalencia según tamaño del rodeo.

2.7.3.2. Epidemiología basada en estudios moleculares

2.7.3.2.1. Diseño experimental

2.7.3.2.1.1. Rodeos bubalinos y bovinos

Para realizar este estudio se seleccionaron 6 rodeos de Corrientes y 1 de Formosa con búfalos serológicamente positivos detectados en el estudio transversal. Se realizó diagnóstico de gestación para establecer cuáles hembras se hallaban gestando con el objeto de tomar muestras en el periparto.

En un establecimiento del departamento de Esquina, provincia de Corrientes, con 12% de animales positivos se analizaron por PCR bubalinos positivos y negativos a FC, ELISA-c y FPA.

Se tomaron muestras en el momento de la faena en frigorífico de hembras positivas a FC provenientes de un rodeo de Formosa. Se analizaron además muestras de sangre entera de 1 rodeo bubalino y 11 rodeos bovinos positivos a FC diagnosticadas en el laboratorio de red SENASA L298, seleccionando de éstos últimos para el estudio molecular aquellos especímenes correspondientes a animales con título ≥ 331 UIFC. Las cantidades de cada tipo de muestra y el criterio de selección utilizado para incluirla en el estudio se muestran en la tabla 7. La ubicación geográfica de los rodeos se muestra en las figuras 7 y 20 de la sección Resultados.

Tabla 7. Detalle de las muestras obtenidas para cultivo y estudios moleculares.

Espécimen	Cantidad	Especie	Criterio de selección	Provincia
Sangre entera	31	Bubalinos	Pos. a FC en estudio transversal	Fsa. – Ctes.
	4	Bubalinos	Pos. a FC en L298	Fsa.
	17	Bubalinos	Pos. y Neg. a FC en estudio transversal	Ctes.
	23	Bovinos	Pos. a FC en L298	Fsa.
Leche	12	Bubalinos	Pos. a FC en estudio transversal	Fsa. – Ctes.
Hisopados y órganos	43	Bubalinos	Pos. a FC en estudio transversal	Fsa. – Ctes.

2.7.3.2.1.2. Muestras

Consistieron en sangre entera con y sin anticoagulante (citrato de sodio 3,4 M), sangre en medio de cultivo específico para *Brucella*, fluido cérvico-vaginal de hembras en periparto en medio de transporte Stuart y en buffer lisis celular, leche de hembras en lactancia y punción de ganglios retrofaríngeos.

De los animales faenados se tomaron alícuotas de líquidos placentarios, líquidos de abomaso y diferentes órganos de fetos. Además se obtuvieron muestras de ganglios linfáticos retromamarios e inguinales, útero y líquido de articulaciones de la madre, según recomendación de OIE (2008).

Los especímenes fueron acondicionados en frascos estériles hasta el momento del cultivo y en bolsas estériles según se describe en el punto 2 del Apéndice hasta proceder a la extracción de DNA.

Muestras de sangre entera, leche y fluido cérvico-vaginal fueron obtenidas al azar de búfalas del establecimiento E11 de Corrientes donde se evaluaron animales serológicamente positivos y negativos.

2.7.3.2.1.3. Análisis

La PCR fue utilizada para identificar las secuencias específicas de los genes *omp31*, *omp2ab*, *alkB-IS711* y *eri* mediante la utilización de los primers B4-B5, DSF-DSR, DSF-DSR2, 416 F- *IS711R* y Eri1-Oligo2, respectivamente. Se seleccionaron al azar productos de PCR para enviar a secuenciar. Se realizó RT-PCR para identificar género (*omp31*), especie (416F- *IS711R*) y para diferenciar *B. abortus* C19 de silvestre (Eri1- Oligo2).

Con las muestras de sangre bubalinas y bovinas se realizó PCR y RT-PCR. Las muestras de hisopados y órganos se utilizaron para cultivo bacteriológico, PCR y RT-PCR, según se describió anteriormente (capítulo 2.2).

2.7.3.3. Caracterización molecular de las cepas de *Brucella*

Se repicaron las cepas de referencia y la obtenida de un aborto bubalino en medio de cultivo específico para *Brucella* y se realizó la tipificación fenotípica según Manual OIE (2008).

Se realizó la extracción del ADN y se procesó mediante PCR. Los primers utilizados para la tipificación fueron los consignados en el punto anterior, además de los pares *B. melitensis* F-*IS711R*, específico para *B. melitensis* y DEL569-*IS711R*, específicos para *B. abortus* bv3, bv5, bv6 y bv9.

Los productos amplificados obtenidos con los distintos pares de primers fueron secuenciados.

Dichas secuencias se utilizaron para realizar alineamientos con las secuencias de las cepas de referencia depositadas en el GenBank. Estas secuencias fueron también comparadas con las obtenidas de bovinos infectados naturalmente por *Brucella* spp. Los alineamientos de todas las secuencias se realizaron con el programa BioEdit®.

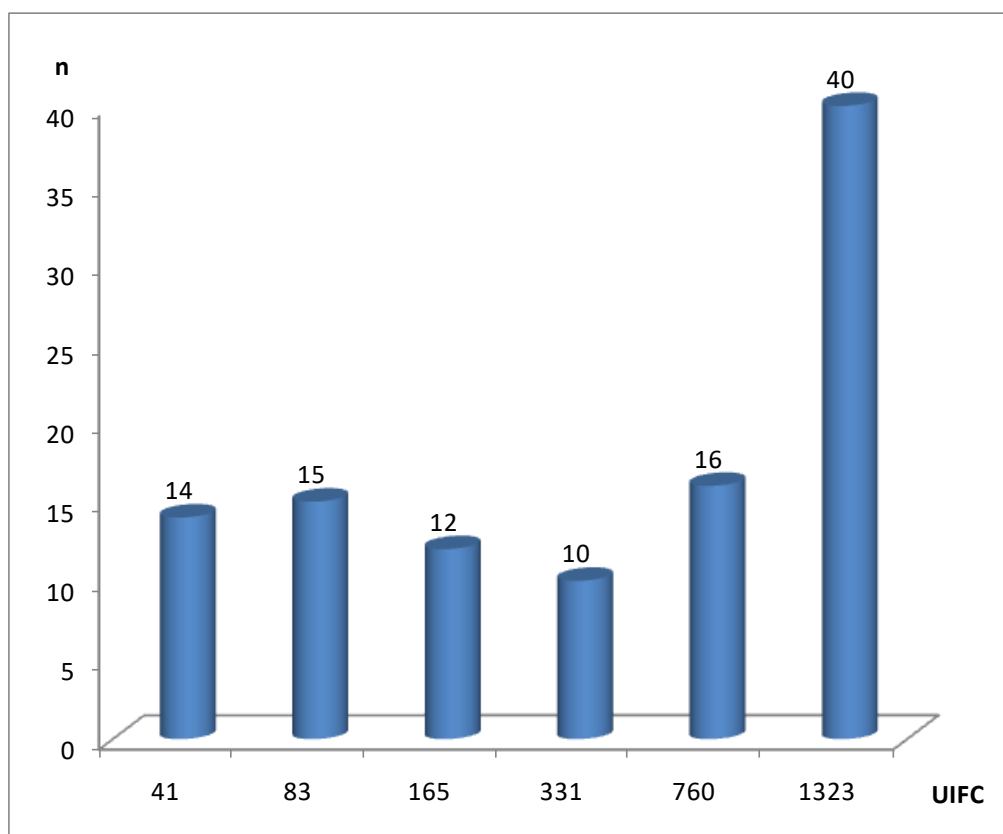
CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Pruebas serológicas en búfalos

3.1.1. Fijación de Complemento como técnica de referencia

Sobre un total de 862 muestras de sueros bubalinos, 107 resultaron positivos a la técnica de FC, y fueron tomados como sueros positivos de referencia. Se detectaron bubalinos positivos en todas las diluciones evaluadas (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribución del número de bubalinos positivos a brucelosis según el título máximo de anticuerpos obtenido en cada dilución de FC (UIFC).

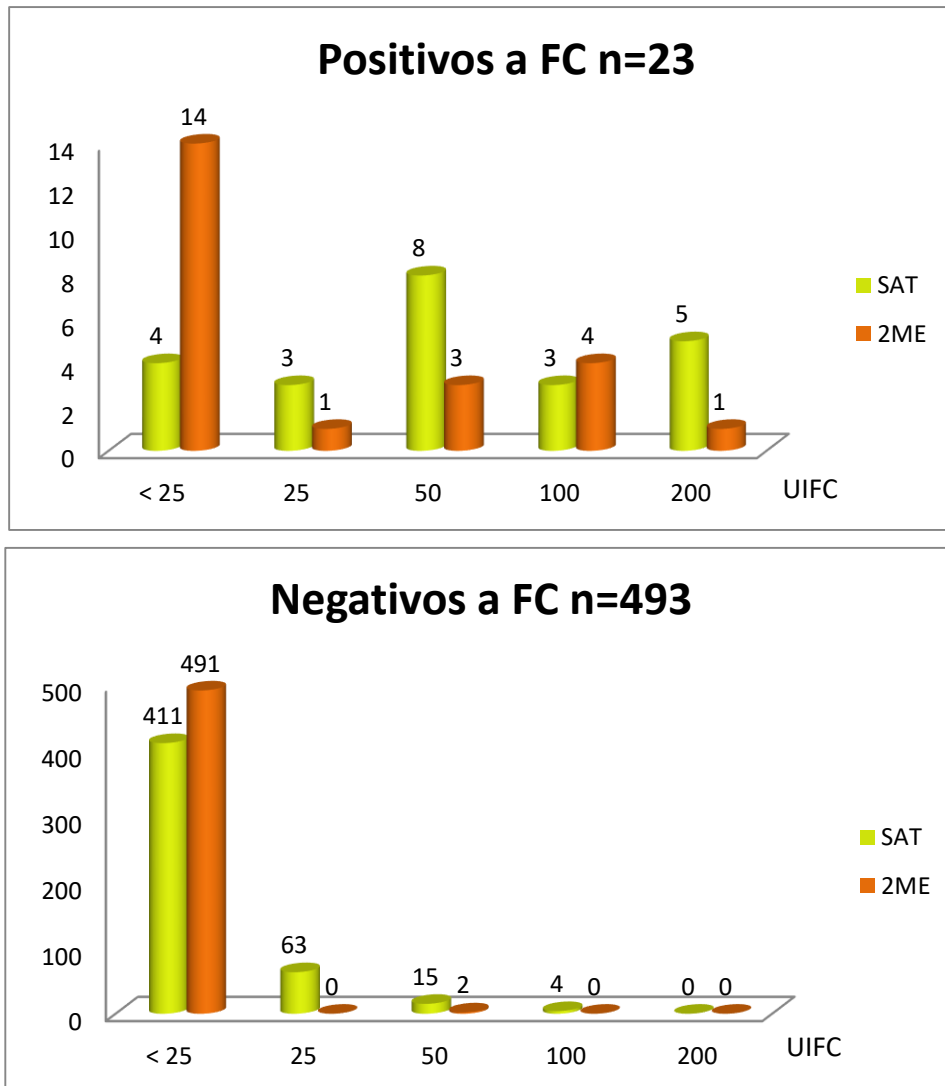


3.1.2. Evaluación de las técnicas serológicas clásicas: BPA - SAT/2ME

Un total de 516 muestras de suero de búfalos pudieron ser analizadas por BPA, SAT y 2ME en paralelo con FC con sólo 23 sueros positivos a FC. Esto resultó en un número muy limitado para determinar la sensibilidad de SAT y 2ME, por lo que se determinó la proporción de positivos en lugar de la estimación de Se , aunque fue de utilidad para marcar una tendencia. De las pruebas convencionales evaluadas para el diagnóstico de brucelosis, BPA mostró la mayor Se relativa con

un valor de 96,6% y una *Es* de 84,2%. Cuando se utilizó el criterio de interpretación recomendado por SENASA, la proporción de positivos a SAT/2ME fue 34,8% (8/23) y la *Es* fue de 99,6% (491/493 sueros negativos a FC). Cuando los resultados se analizaron individualmente la proporción de positivos a SAT fue 21,7% (5/23) y a 2ME fue de 34,8% (8/23), con una *Es* de 100% y 99,8%, respectivamente. De los positivos a FC, el mayor número mostró títulos de 50UI para SAT y < 25UI para 2ME (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribución de los niveles de anticuerpos contra *Brucella* spp según las diluciones usadas para SAT-2-ME en sueros de búfalos positivos (n=23) y negativos (n=493) analizados por FC.



La concordancia entre SAT/2ME y FC fue del 96,7% con un valor *kappa* de 0,471 ($\pm 0,040$).

La mayor proporción de positivos fue detectada por SAT/2ME cuando los sueros superaban las 106 UIFC (Tabla 8).

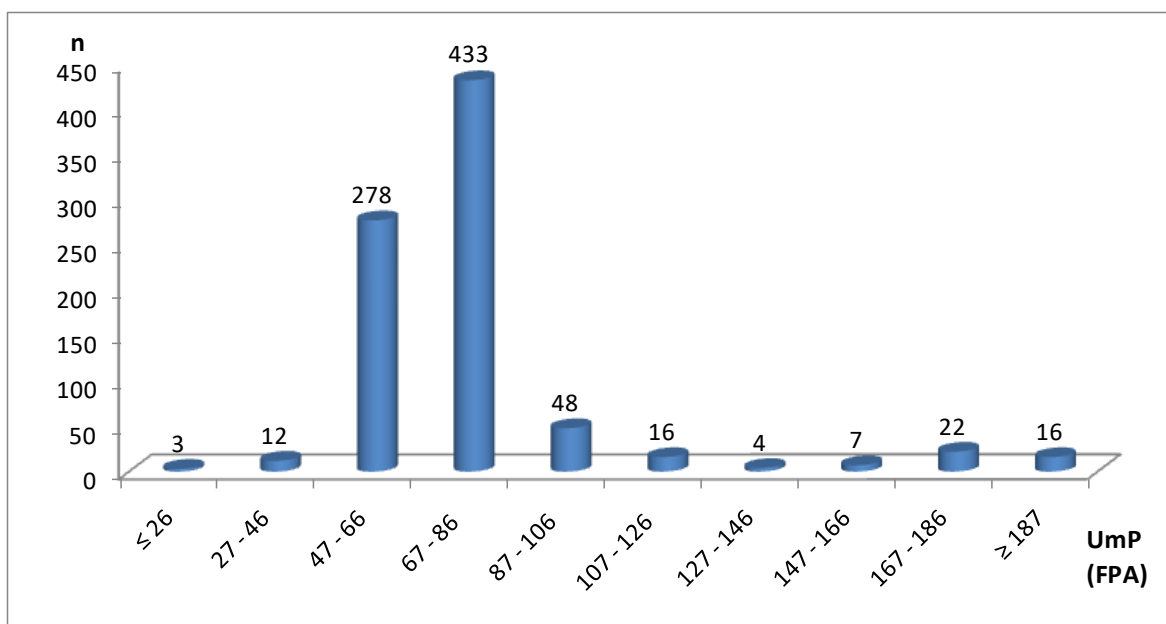
Tabla 8. Distribución de los bubalinos reaccionantes en cada dilución de SAT y 2ME, para cada rango establecido en UIFC, en 23 muestras de sueros positivos a FC.

UIFC (rango)	FC (n)	SAT/2ME (UI)				SAT+/FC+ (n)	2ME+/FC+ (n)
		25	50	100	200		
41 - 83	12	2/0	7/1	1/0	0/0	0/12	1/12
106 - 331	6	0/1	2/2	1/2	2/0	2/6	4/6
425 - 1323	5	0/0	0/0	0/2	3/1	3/5	3/5
						5/23	8/23

3.1.3. Validación de las pruebas serológicas de nueva generación: FPA, ELISA-c, ELISA-i M23 y ELISA-i A/G

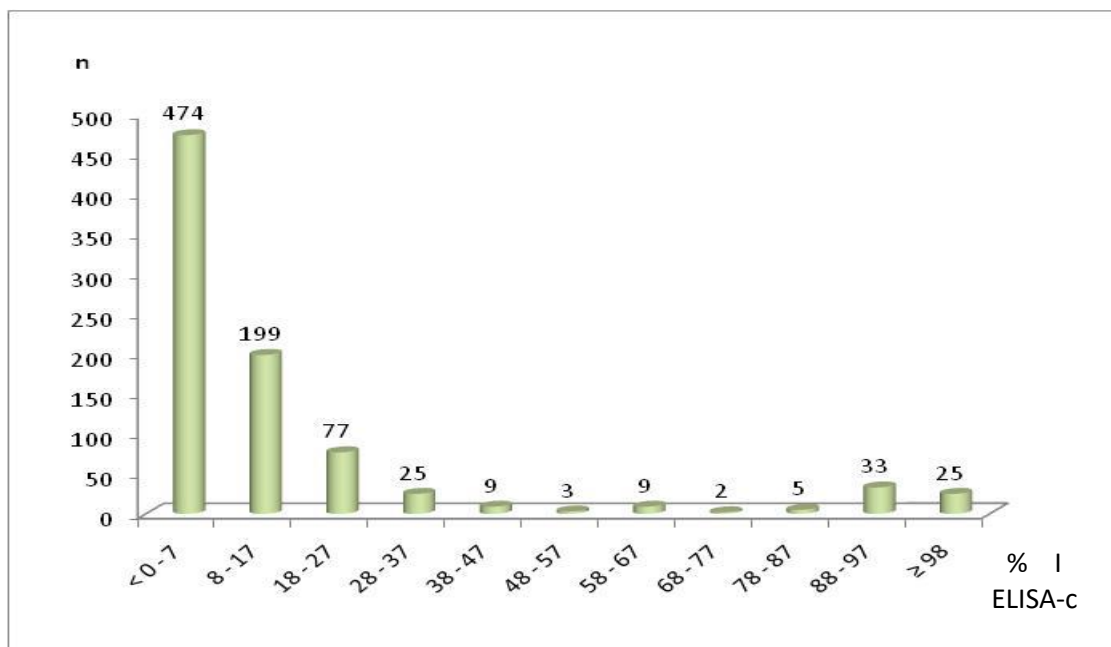
En los gráficos 3, 4, 5 y 6 se observa la distribución de los valores de UmP (FPA), % I (ELISA-c) y % P (ELISA-i M23 y ELISA-i A/G), respectivamente, obtenidos en los sueros de búfalos utilizados para la validación de las técnicas para el diagnóstico de brucelosis (n= 862).

Gráfico 3. Distribución de las unidades de milipolarización (UmP), obtenidos en los sueros bubalinos analizados mediante FPA (n=839).



Veintitrés muestras de sueros bubalinos no pudieron ser leídas por el analizador de polarización de fluorescencia, porque éste indicaba “error”.

Gráfico 4. Distribución de los porcentajes de inhibición (% I) obtenidos en los sueros bubalinos analizados mediante ELISA-c (n= 861).



Una muestra de suero no fue analizada por ELISA-c por volumen insuficiente.

Gráfico 5. Distribución de los porcentajes de positividad (%P) obtenidos en los sueros bubalinos analizados mediante ELISA-i M23 (n=862).

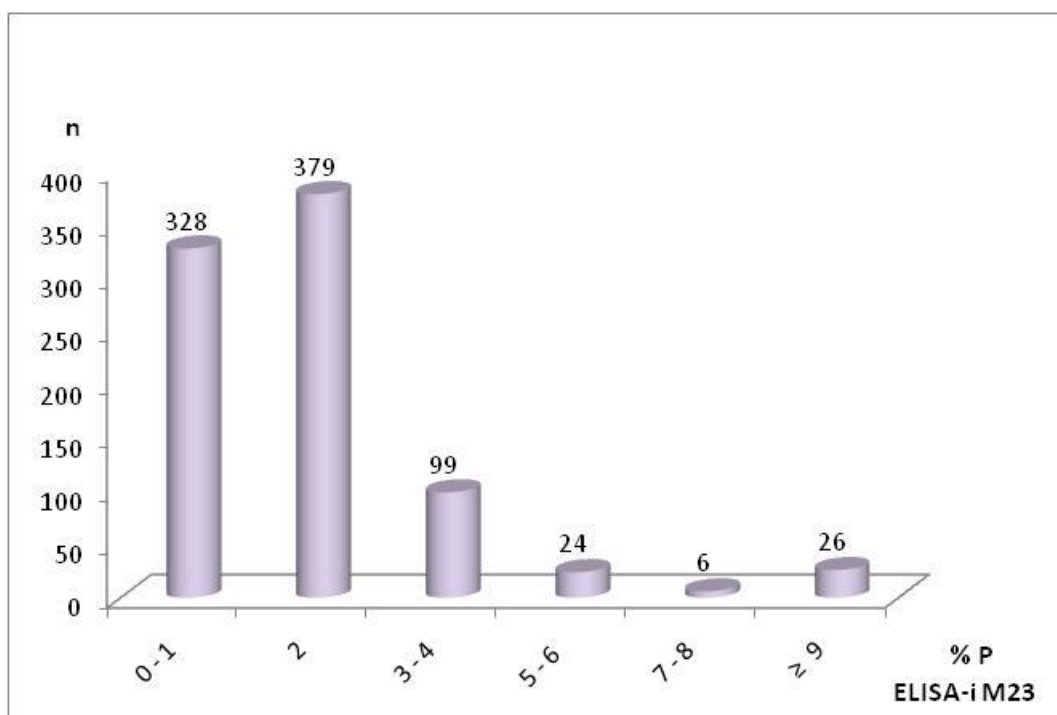
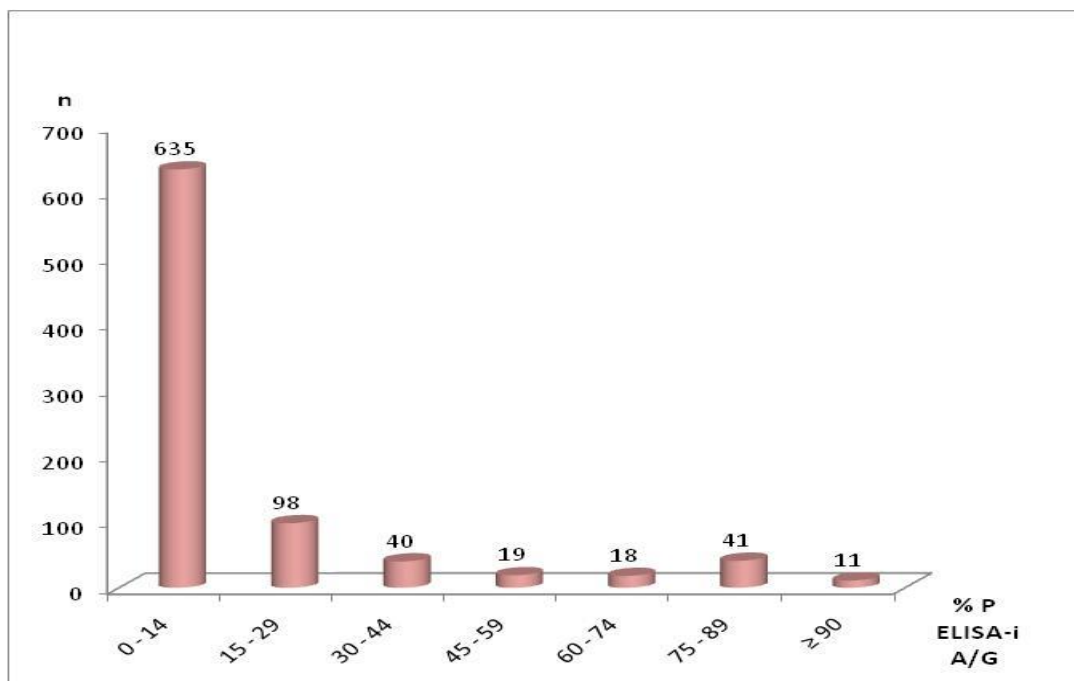


Gráfico 6. Distribución de los porcentajes de positividad (%P) obtenidos en sueros bubalinos analizados mediante ELISA-i A/G (n=862).



La comparación de los resultados de las pruebas serológicas de nueva generación en relación con FC, a través del análisis ROC (Receiving Operator Characteristic) se presenta en los gráficos 7, 8, 9 y 10, donde se observa el área bajo la curva, la distribución de los resultados, el punto óptimo de corte para diferenciar los positivos de los negativos y los valores de *Se* y *Es* relativas obtenidos para cada prueba.

Gráfico 7. Análisis ROC para FPA. Área bajo la curva ROC (A), punto de corte y distribución de positivos y negativos (B).

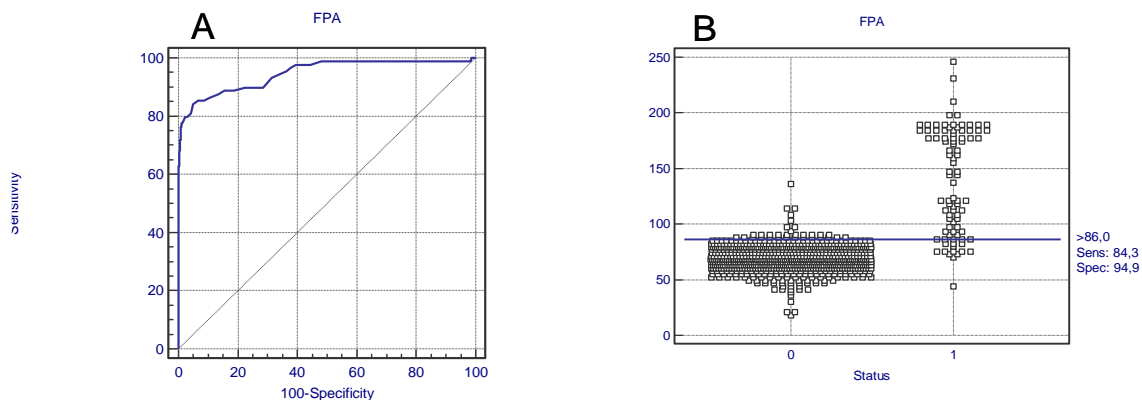


Gráfico 8. Análisis ROC para ELISA-c. Área bajo la curva ROC (A), punto de corte y distribución de positivos y negativos (B).

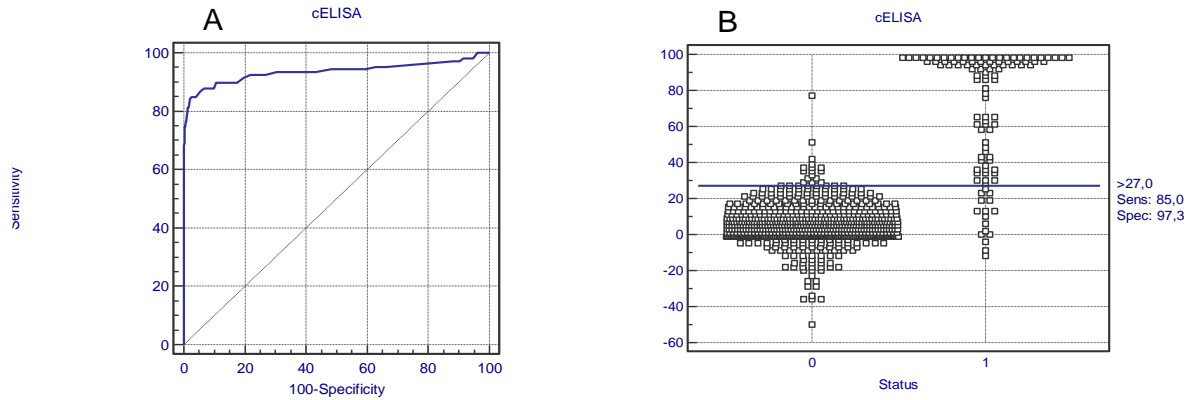


Gráfico 9. Análisis ROC para ELISA-i M23. Área bajo la curva ROC (A), punto de corte y distribución de positivos y negativos (B).

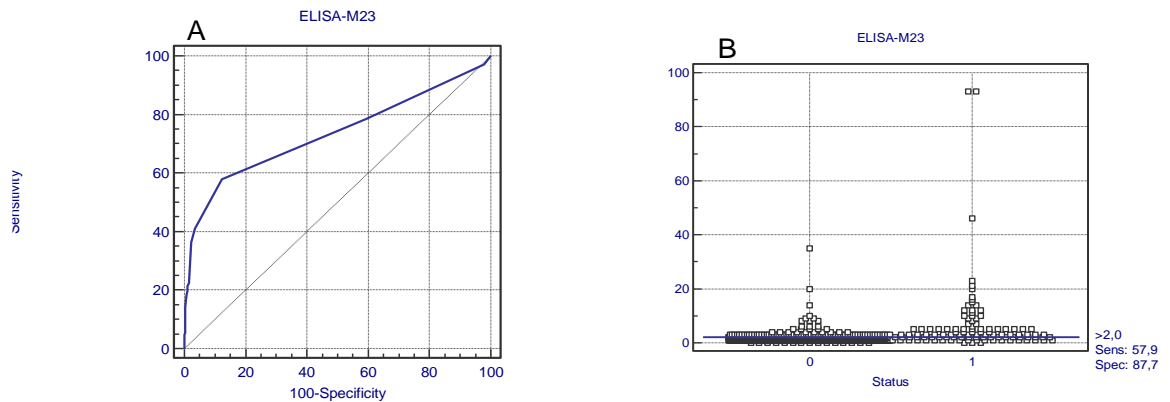
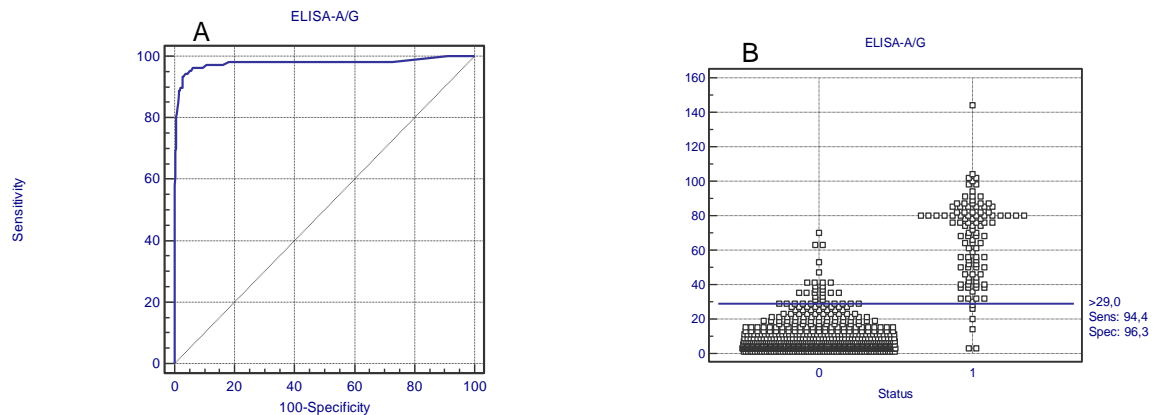


Gráfico 10. Análisis ROC para ELISA-i A/G. Área bajo la curva ROC (A), punto de corte y distribución de positivos y negativos (B).



El análisis del área bajo la curva ROC determinó que el mejor rendimiento fue para ELISA-i A/G, seguida en orden decreciente, por las pruebas de FPA y ELISA-c. ELISA-i M23 no fue apropiada para su uso en búfalos en las condiciones evaluadas (Tabla 9).

Tabla 9. Área bajo la curva ROC e intervalo de confianza para cada una de las técnicas serológicas de nueva generación evaluadas, en relación con FC.

Técnica	Positivos n	Negativos n	Área bajo la curva	Intervalo de confianza (95%)	Evaluación cualitativa
FPA	76*	713*	0,947	0,930 a 0,961	Muy buena
ELISA-c	92	735**	0,936	0,917 a 0,951	Muy buena
ELISA-i M23	63	663	0,733	0,702 a 0,762	Regular
ELISA-i A/G	102	728	0,977	0,965 a 0,986	Excelente
FC	107	755			

* Hubo 18 sueros positivos y 5 negativos que no pudieron ser analizados (lectura fallida).

** Un suero no pudo ser procesado por insuficiente volumen

En la tabla 10 se resumen los valores de *Se*, *Es*, punto de corte, grado de acuerdo y valor *kappa* para las técnicas de nueva generación evaluadas en sueros bubalinos.

Tabla 10. Valores observados para los diferentes parámetros evaluados en la validación de las técnicas serológicas de nueva generación, respecto de FC.

Técnica	<i>Se</i> (%)	<i>Es</i> (%)	Punto de corte	Acuerdo (%)	<i>Kappa</i> (índice)
FPA	84,3*	94,9*	≥ 87 UmP	94,0	0,719
ELISA-c	85,0	97,3	≥ 28 % I	96,1	0,821
ELISA-i M23	57,9	87,7	≥ 3 % P	84,2	0,392
ELISA-i A/G	94,4	96,3	≥ 30 % P	96,3	0,843
FC (n)	107 (Pos)	755 (Neg)			

* *Se* y *Es* para FPA excluyen los resultados de 23 sueros con lecturas fallidas.

FPA mostró una eficiencia menor debido a que el estatus no pudo ser establecido en 2,67% de las muestras (23/862) debido a las lecturas fallidas.

La mayor polarización entre resultados positivos y negativos se encontró en la técnica de ELISA-c. Los valores máximos, mínimos, el promedio y los desvíos estándar de los resultados positivos y negativos para cada técnica se presentan en la tabla 11.

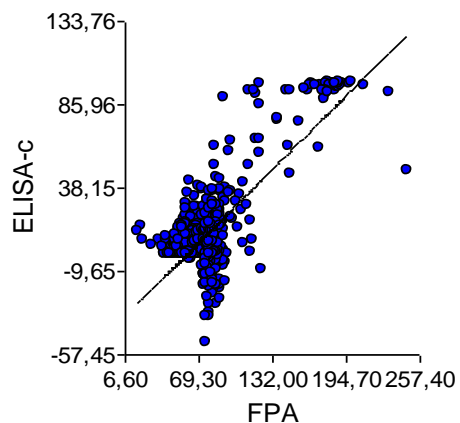
Tabla 11. Valor máximo, mínimo y promedio de anticuerpos obtenido para cada técnica evaluada en bubalinos positivos y negativos.

Técnica	Valor máximo	Valor mínimo	Promedio positivos (± 1 DS)	Promedio negativos (± 1 DS)
FPA	246 UmP	18 UmP	132,97 ($\pm 43,90$) UmP	68,94 ($\pm 10,39$)UmP
ELISA-c	99 % I	-50 % I	72,39 ($\pm 27,80$)% I	5,27 ($\pm 9,62$)% I
ELISA-i M23	93 % P	0 % P	6,75($\pm 11,39$) % P	1,51 ($\pm 0,55$)% P
ELISA-i A/G	144 % P	1 % P	64,55 ($\pm 22,74$) % P	7,80 ($\pm 6,17$)% P

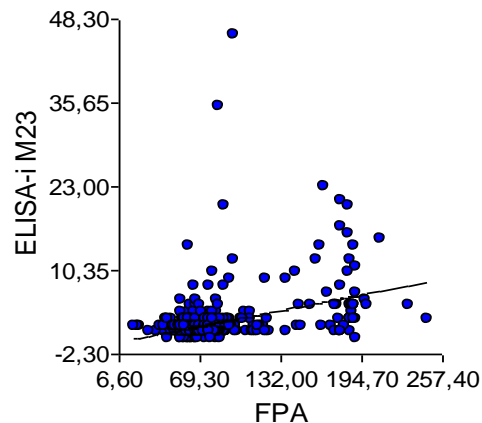
El análisis de asociación entre los resultados obtenidos por las técnicas serológicas de nueva generación, mostró un Coeficiente de Correlación (R^2) que varió entre 0,07 y 0,67. El gráfico 11 muestra la tendencia de la asociación de los valores continuos entre cada par de técnicas evaluadas.

Gráfico 11. Coeficiente de correlación (R^2) entre los valores continuos de pruebas cuantitativas.

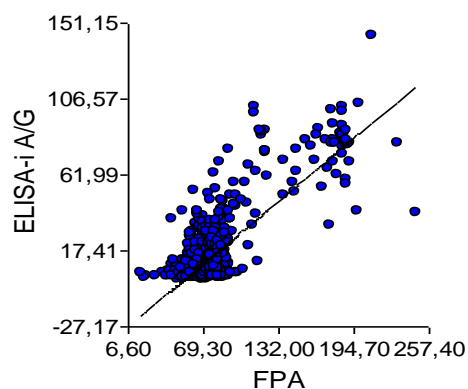
FPA y ELISA-c ($R^2=0,64$)



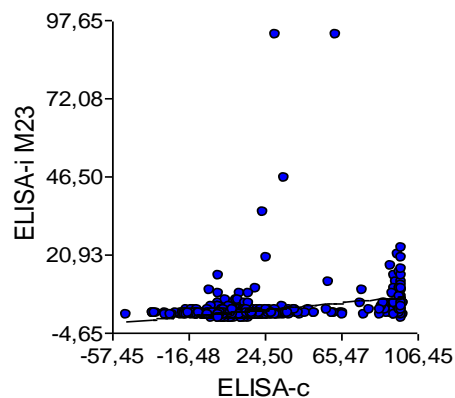
FPA y ELISA-i M23 ($R^2=0,14$)



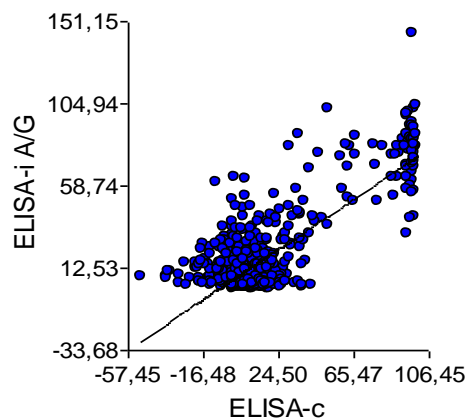
FPA y ELISA-i A/G ($R^2= 0,66$)



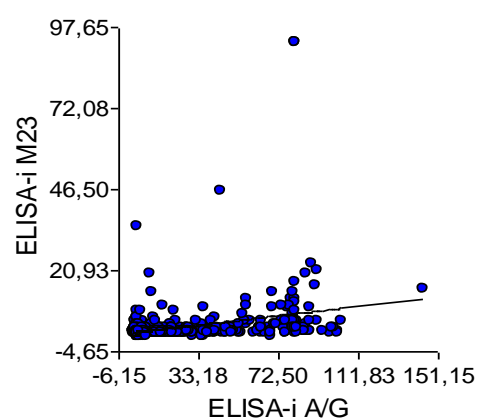
ELISA-c y ELISA-i M23 ($R^2=0,07$)



ELISA-c y ELISA-i A/G ($R^2=0,67$)



ELISA-i A/G y ELISA-i M23 ($R^2= 0,14$)



En las tablas 12 y 13 se muestran los porcentajes de acuerdo entre los resultados observados para los sueros positivos en cada técnica evaluada, en relación a los rangos establecidos para FC (UIFC).

Tabla 12. Porcentajes de acuerdo entre los resultados positivos obtenidos mediante las distintas técnicas de ELISA y las UFC determinadas por FC, en 107 muestras de sueros.

UIFC (rango)	FC (n)	ELISA-c (n)	Acuerdo (%)	ELISA-i M23 (n)	Acuerdo (%)	ELISA-i A/G (n)	Acuerdo (%)
41 - 83	29	16	55,2	11	37,9	24	82,8
106 - 331	22	20	90,9	7	31,8	22	100,0
425 - 1323	56	56	100,0	45	80,4	56	100,0

Debido a que 23 sueros (2,7%) analizados por FPA no pudieron ser leídos, en la tabla 15 se muestra el acuerdo obtenido en 89 muestras positivas a FC.

Tabla 13. Porcentajes de acuerdo entre los resultados positivos obtenidos por FPA, y las UFC determinadas por FC en 89 muestras de sueros.

UIFC (rango)	FC (n)	FPA (n)	Acuerdo (%)
41 - 83	27	16	59,3
106 - 331	18	16	88,9
425 - 1323	44	44	100,0

3.2. Epidemiología comparativa de brucelosis en rodeos bovinos y bubalinos

3.2.1. Epidemiología basada en estudios serológicos

3.2.1.1. Encuesta epidemiológica

Para la provincia de Formosa, sobre un total de 17 establecimientos encuestados y 3.793 muestras analizadas para el diagnóstico de brucelosis en diferentes laboratorios de Red del SENASA, la proporción global de bubalinos positivos (n=145), fue de 3,8 %. En el caso de los bovinos, fueron analizados 36 establecimientos y 18.657 muestras con una proporción global de 0,6% de sueros positivos (n=106). La distribución de los establecimientos bubalinos y bovinos positivos serológicamente a brucelosis por departamento se muestra en las tablas 14 y 15.

Tabla 14. Proporción de sueros bubalinos positivos a brucelosis por establecimiento y promedio por departamento en la provincia de Formosa.

Provincia	Departamento	Establecimientos Analizados	Sueros n	Positivos n	Positivos por establecimiento %	Positivos por Departamento %
Formosa	Bermejo n=12	F.I	12	0	0,00	0
		F.II	72	0	0,00	
		F.III	62	1	1,61	
	Formosa n=594	F.IV	43	2	4,65	1,51
		F.V	344	6	1,74	
		F.VI	51	0	0,00	
		F.VII	22	0	0,00	
		F.VIII	64	0	0,00	
	Laishí n=153	F.IX	75	1	1,33	0,65
		F.X	14	0	0,00	
		F.XI	44	0	0,00	
	Patiño n=87	F.XII	43	3	6,98	3,45
		F.XIII	199	15	7,54	
	Pilcomayo n=329	F.XIV	94	17	18,09	10,03
		F.XV	36	1	2,78	
		F.XVI	2.568	99	3,86	
	Pirané n=2.618	F.XVII	50	0	0,00	3,78

Fuente: Área Brucelosis – CEDIVEF. Laboratorio de Red SENASA L298

Tabla 15. Proporción de sueros bovinos positivos a brucelosis por establecimiento y promedio por departamento en la provincia de Formosa.

Provincia	Departamento	Establecimientos Analizados	Sueros n	Positivos n	Positivos por establecimiento %	Positivos por departamento %
Formosa	Formosa n= 11.219	F.1	10.052	11	0,1	0,15
		F.2	73	1	1,4	
		F.3	133	0	0,0	
		F.4	256	0	0,0	
		F.5	37	0	0,0	
		F.6	164	0	0,0	
		F.7	11	0	0,0	
		F.8	312	0	0,0	
		F.9	104	0	0,0	
		F.10	16	0	0,0	
		F.11	28	3	10,7	
		F.12	33	2	6,1	
	Laishí n=1.975	F.13	18	0	0,0	0,15
		F.14	1.900	0	0,0	
		F.15	36	1	2,8	
		F.16	21	2	9,5	
		F.17	49	0	0,0	
		F.18	117	0	0,0	
		F.19	10	0	0,0	
		F.20	17	0	0,0	
	Patiño n= 539	F.21	77	2	3	0,7
		F.22	98	1	1	
		F.23	171	2	1,2	
		F.24	82	0	0,0	
		F.25	950	0	0,0	
		F.26	389	3	0,8	
		F.27	353	12	3,4	
	Pilcomayo n=1.937	F.28	163	4	2,5	0,9
		F.29	170	1	0,6	
		F.30	32	0	0,0	
		F.31	86	0	0,0	
		F.32	1.916	0	0,0	
		F.33	140	44	30,6	
	Pirané n=2.987	F.34	297	14	4,7	2
		F.35	199	1	0,5	
		F.36	147	2	1,4	

Fuente: Laboratorios de Red SENASA L087 y L298.

Para la provincia de Corrientes, sobre un total de 8 establecimientos encuestados y 416 muestras analizadas, la proporción global de brucelosis en bubalinos fue de 0,5 % (n=2). En el caso de los sueros bovinos, fueron analizados 91 establecimientos y 27.974 muestras con una proporción global de 0,2% de sueros positivos. La distribución de los establecimientos bubalinos y bovinos positivos serológicamente a brucelosis por departamento se muestra en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Proporción de sueros bubalinos positivos a brucelosis por establecimiento y promedio por departamento en la provincia de Corrientes.

Provincia	Departamento	Establecimientos analizados	Sueros n	Positivos n	Positivos por establecimiento %	Positivos por departamento %
Corrientes	Capital n=37	C.I	37	0	0	0
	Esquina n=186	C.II	160	2	1,25	1,07
		C.III	26	0	0	
	Goya n=41	C.IV	41	0	0	0
	Itatí n=10	C.V	10	0	0	0
	Mercedes n=95	C.VI	95	0	0	0
	S.L. del Palmar n=36	C.VII	36	0	0	0
	San Roque n=11	C.VIII	11	0	0	0

Fuente: Laboratorio de Red SENASA L087.

Tabla 17. Proporción de sueros bovinos positivos a brucelosis mediante BPA, SAT y 2ME por establecimiento y promedio por departamento en la provincia de Corrientes.

Provincia	Departamento	Establecimientos analizados	Sueros n	Positivos n	Positivos por establecimiento %	Positivos por departamento %
Corrientes	Capital n= 6.162	C.1	18	0	0,0	0,11
		C.2	28	0	0,0	
		C.3	640	1	0,2	
		C.4	35	0	0,0	
		C.5	802	0	0,0	
		C.6	17	0	0,0	
		C.7	205	0	0,0	
		C.8	4.180	0	0,0	
		C.9	22	0	0,0	
		C.10	110	6	5,5	
		C.11	22	0	0,0	

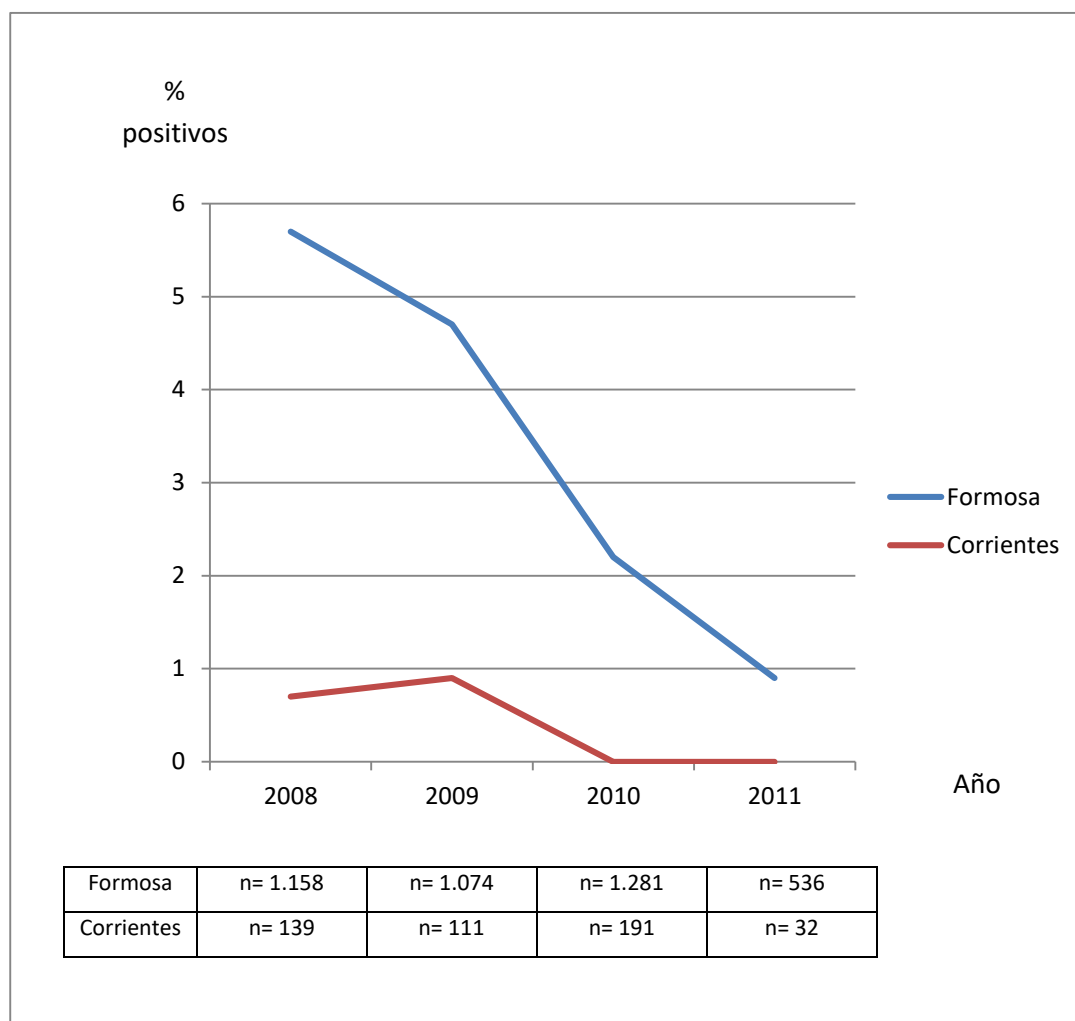
	C.12	67	0	0,0	
	C.13	16	0	0,0	
Esquina n=471	C.14	294	0	0,0	0,21
	C.15	88	0	0,0	
	C.16	89	1	1,1	
	C.17	57	0	0,0	
General Paz n=4.579	C.18	14	0	0,0	0,13
	C.19	44	0	0,0	
	C.20	20	0	0,0	
	C.21	4.033	6	0,1	
	C.22	411	0	0,0	
	C.23	27	0	0,0	
	C.24	46	0	0,0	
	C.25	31	0	0,0	
	C.26	55	0	0,0	
	C.27	30	0	0,0	
	C.28	69	0	0,0	
	C.29	49	0	0,0	
	C.30	129	2	1,6	
	C.31	17	0	0,0	
	C.32	16	1	6,3	
	C.33	140	9	6,4	
	C.34	10	0	0,0	
	C.35	18	0	0,0	
	C.36	16	0	0,0	
Goya n= 1.835	C.37	16	0	0,0	1,25
	C.38	20	0	0,0	
	C.39	120	0	0,0	
	C.40	37	0	0,0	
	C.41	20	0	0,0	
	C.42	57	0	0,0	
	C.43	59	0	0,0	
	C.44	62	0	0,0	
	C.45	41	0	0,0	
	C.46	79	0	0,0	
	C.47	178	0	0,0	
	C.48	53	0	0,0	
	C.49	149	0	0,0	
	C.50	102	11	10,8	
	C.51	114	0	0,0	
	C.52	56	0	0,0	

	C.53	19	0	0,0	
	C.54	30	0	0,0	
Itatí n=289	C.55	23	0	0,0	0,35
	C.56	47	0	0,0	
	C.57	103	1	1,0	
	C.58	86	0	0,0	
	C.59	745	0	0,0	
Mercedes n=7.576	C.60	1.893	0	0,0	0,12
	C.61	13	0	0,0	
	C.62	16	0	0,0	
	C.63	585	0	0,0	
	C.64	65	0	0,0	
	C.65	185	0	0,0	
	C.66	120	0	0,0	
	C.67	189	0	0,0	
	C.68	388	0	0,0	
	C.69	371	6	1,6	
	C.70	42	0	0,0	
	C.71	56	0	0,0	
	C.72	128	0	0,0	
	C.73	15	0	0,0	
	C.74	2.765	3	0,1	
S.L. del Palmar n=3.501	C.75	2.843	11	0,4	0,4
	C.76	75	0	0,0	
	C.77	74	0	0,0	
	C.78	99	0	0,0	
	C.79	48	0	0,0	
	C.80	326	3	0,9	
	C.81	36	0	0,0	
San Roque n= 3.561	C.82	1.387	1	0,1	0,08
	C.83	589	1	0,2	
	C.84	189	0	0,0	
	C.85	851	0	0,0	
	C.86	133	0	0,0	
	C.87	16	0	0,0	
	C.88	231	0	0,0	
	C.89	80	0	0,0	
	C.90	62	1	1,6	
	C.91	23	0	0,0	

Fuente: Laboratorio de Red SENASA L087.

La evolución de la brucelosis en rodeos bubalinos en los últimos años, muestra una disminución progresiva de los reactores positivos en la provincia de Formosa, mientras que en Corrientes la cantidad de reactores es menor a la de Formosa y se mantiene estable con valores menores al 1% (gráfico 11).

Gráfico 11. Bubalinos. Evolución de la proporción de positivos y número de sueros analizados en los últimos cuatro años en las provincias de Formosa y Corrientes.

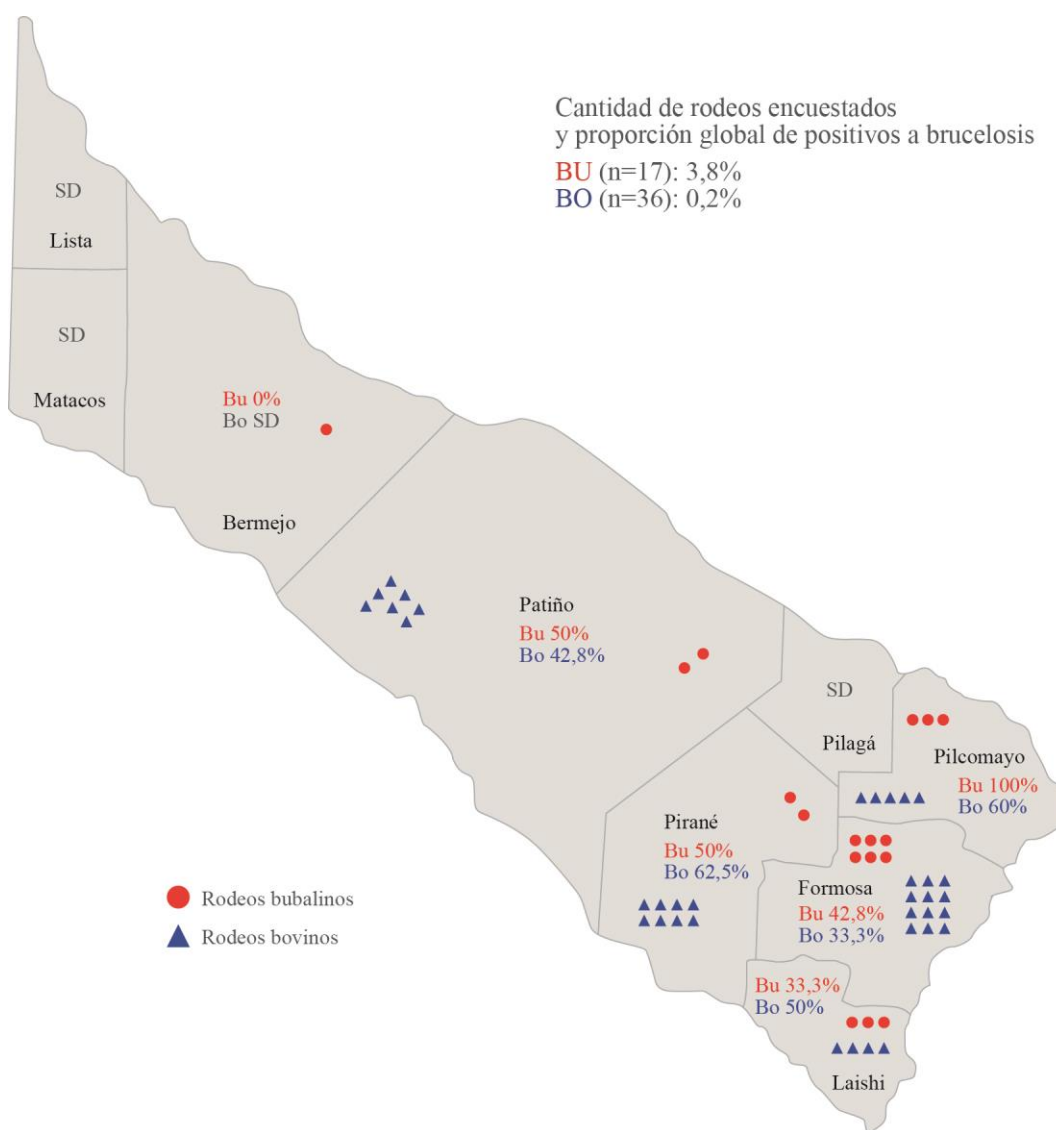


En la figura 7 se visualiza la ubicación geográfica de los rodeos bubalinos y bovinos encuestados y la proporción de positivos a brucelosis para cada especie en los correspondientes departamentos de las provincias de Formosa y Corrientes.

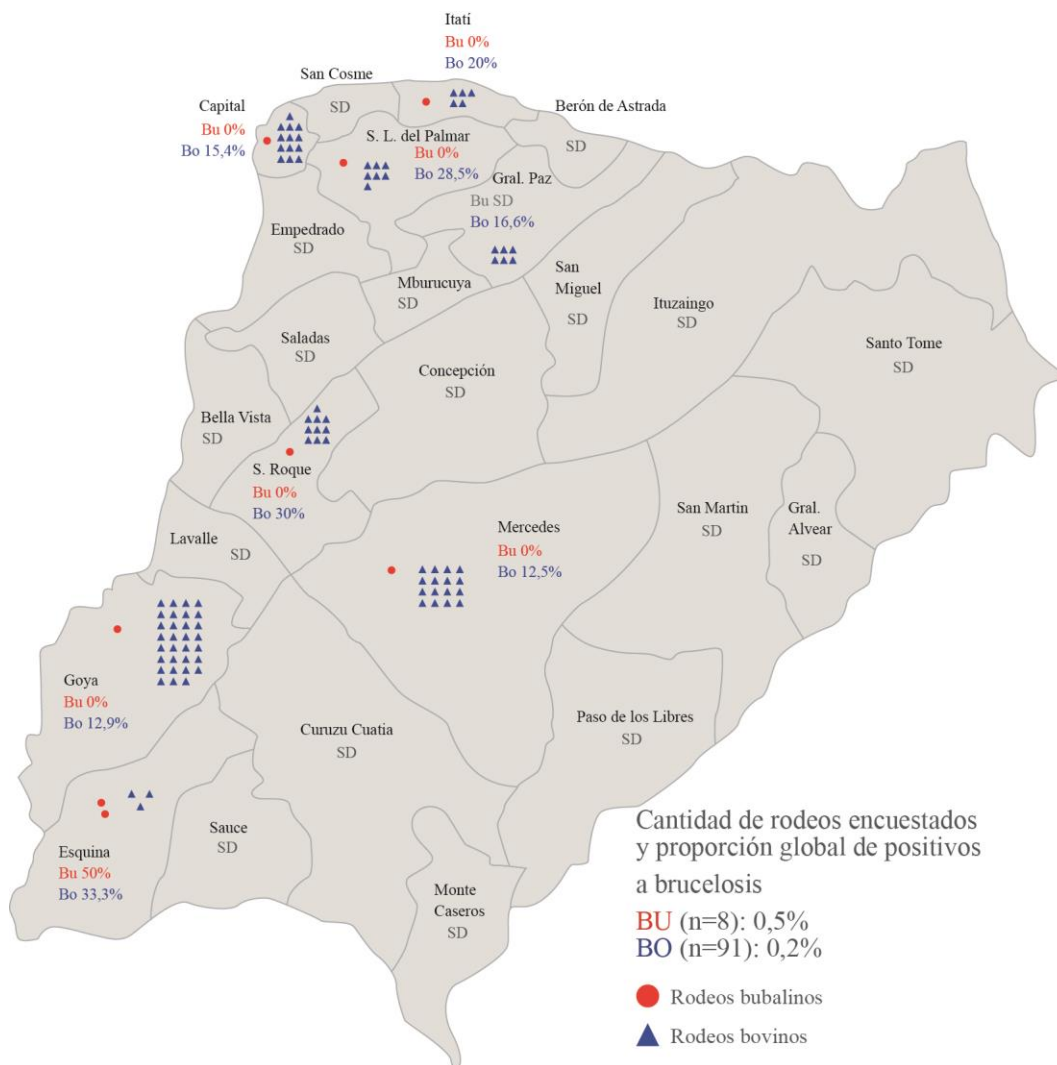
En la provincia de Formosa se observó una concentración de positivos en los departamentos Pirané, Pilcomayo y Patiño para ambas especies. En Corrientes los búfalos positivos se agruparon en el departamento Esquina y los bovinos en Goya.

Figura 7.

A. Formosa. Ubicación de los rodeos bubalinos y bovinos encuestados, proporción de rodeos positivos en cada departamento y proporción global de positivos para cada especie.



B. Corrientes. Ubicación y cantidad de rodeos bubalinos y bovinos encuestados, proporción de rodeos positivos en cada departamento y proporción global de positivos para cada especie.



3.2.1.2. Estudio transversal en rodeos bubalinos

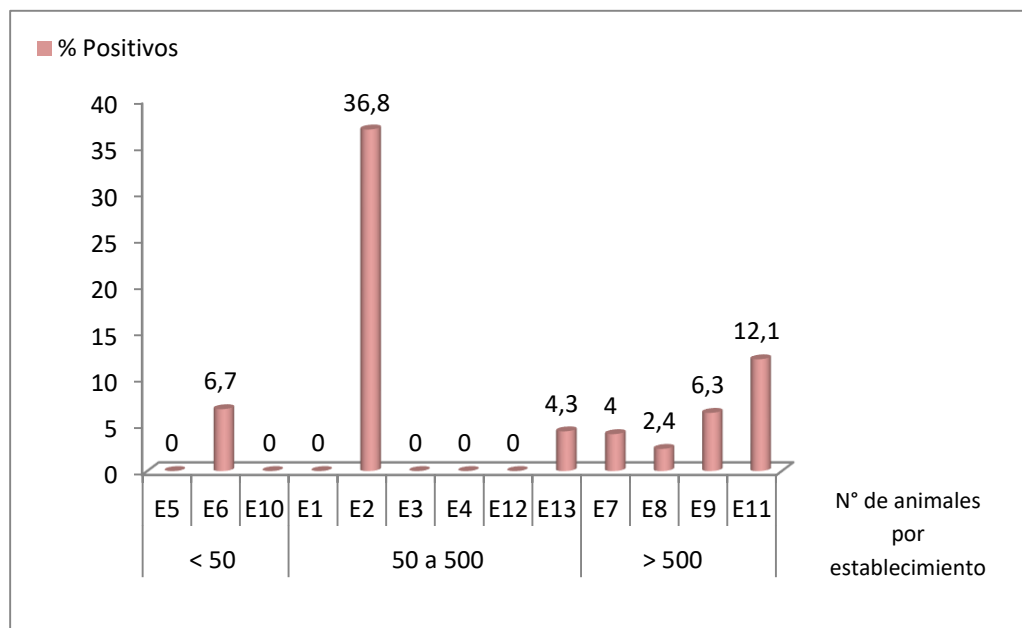
Mediante FC se detectaron 7 rodeos positivos de los 13 seleccionados (53,8%). La prevalencia encontrada en los rodeos varió entre 2,4% y 36.8%. La prevalencia global hallada para toda la región fue de 7,4 % (58/788). La prevalencia para Corrientes fue de 4,3% (24/561) mientras que para Formosa fue de 15% (34/227). El número de bovinos positivos varió según la prueba serológica utilizada (Tabla 18).

Tabla 18. Cantidad de muestras analizadas por establecimiento de búfalos y número de positivos, según las distintas técnicas de diagnóstico en las provincias de Corrientes y Formosa.

Provincia	Establecimientos	Muestras	Positivos a diferentes pruebas serológicas				
	bubalinos	analizadas	FC	FPA	ELISA-c	ELISA-i M23	ELISA-i A/G
	Identificación	n					
Corrientes	E1	16	0	0	1	1	0
	E2	19	7	7	7	9	7
	E3	45	0	0	0	19	0
	E4	43	0	0	2	4	0
	E5	8	0	0	0	0	0
	E6	15	1	1	2	2	1
	E7	150	6	5	5	17	13
	E8	125	3	2	2	15	7
	E9	95	6	4	2	8	7
	E 10	12	0	0	0	0	0
	E 11	33	4	5	4	5	5
Formosa	E 12	142	2	20	10	19	7
	E 13	85	4	14	0	9	9
TOTAL		788	33	58	35	108	56

La mayor proporción de establecimientos infectados se encontró en el estrato de más de 500 animales, y no hubo relación entre el porcentaje de bubalinos infectados con el tamaño del rodeo (Gráfico 12).

Gráfico 12. Prevalencia serológica de brucelosis en establecimientos bubalinos estratificados por tamaño de rodeo.



3.2.2. Epidemiología basada en estudios moleculares

3.2.2.1. Caracterización molecular de *Brucella* spp. a partir de muestras de sangre de bovinos y búfalos serológicamente positivos

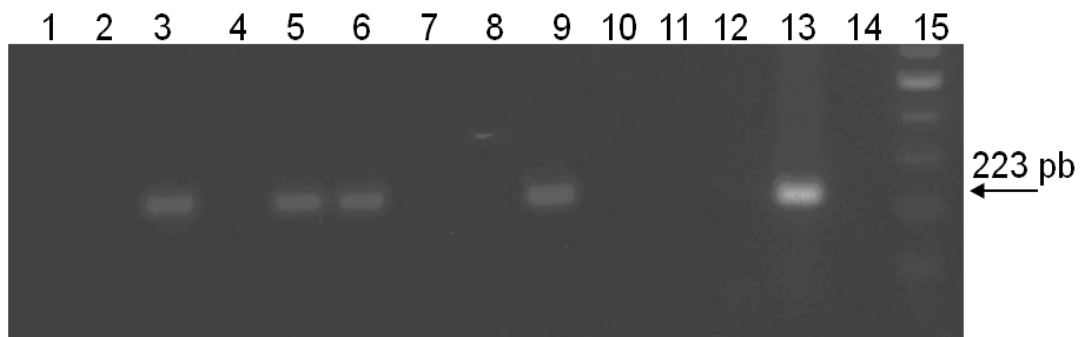
La amplificación de las secuencias específicas de *Brucella* spp. a partir de muestras de sangre tanto en búfalos como en bovinos se observó sólo en algunas muestras positivas a FC y las secuencias amplificadas de los fragmentos no siempre fueron legibles.

3.2.2.1.1. Gen *omp31*

Los primers B4-B5 amplificaron fragmentos de 223 pb en 8 de las 35 muestras de búfalos (22,8%) y en las 23 muestras de bovinos (100%) positivas a FC (Figura 8). Las muestras bubalinas positivas correspondieron a las provincias de Corrientes y Formosa mientras que las muestras bovinas pertenecían sólo a Formosa.

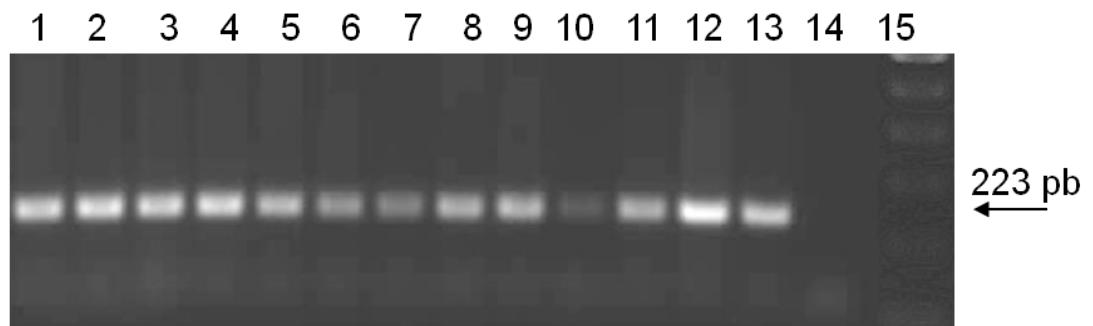
Figura 8. Amplificación de un fragmento de 223 pb del gen *omp31* con primers B4-B5.

A. Búfalos



Calles 1-12 muestras de búfalos; 13, *B. abortus* bv 1; 14, control negativo; 15, marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®). Calles 3, 5, 6 y 9 muestra positivas.

B. Bovinos.



Calles 1-12 muestras de bovinos; 13, *B. abortus* bv 1; 14, control negativo; 15, marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®).

Las secuencias amplificadas de bovinos fueron específicas de género (*Brucella* spp.) (Figura 9). Los amplicones obtenidos para búfalos no tuvieron la concentración de ADN suficiente para su secuenciación.

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de un fragmento del gen *omp31* mediante análisis Blast en la base de datos GenBank.

```

B.abortus 2308 bv1 TGGCTCGGTTGCGCATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCTATTGGG 80
B.abortus RN1 bv1 ..... 80
B.abortus C19 bv1 ..... 80
29-5065 ..... 80
66-5065 ..... 80

B.abortus 2308 bv1 CCTATAACGGCACCGCCCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCCTTACCCGGAAACG 160
B.abortus RN1 bv1 ..... 160
B.abortus C19 bv1 ..... 160
29-5065 ..... 160
66-5065 ..... 160
B.abortus 2308 bv1 ATCCATATCGTTCGCGCTAAGGATGCAAAACATCAAATCGGTTCGACAGCCTGAAAGGCAAGCGCG 224
B.abortus RN1 bv1 ..... 224
B.abortus C19 bv1 ..... 224
29-5065 ..... 224
66-5065 ..... 224

```

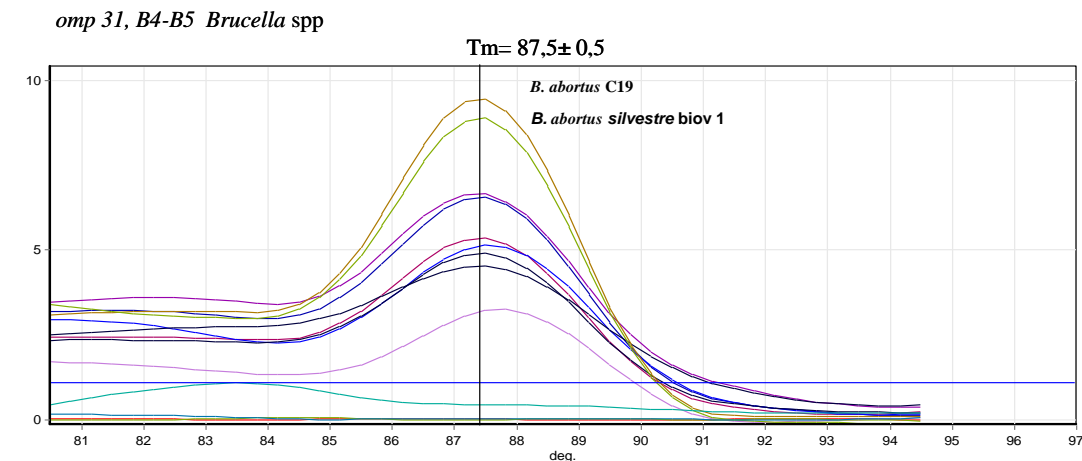
Se utilizaron las secuencias de *B. abortus* 2308 (GenBank AM040264.1) *B. abortus* RN1 bv1 y *B. abortus* cepa 19 (GenBank CP000887.1).

El análisis de las secuencias amplificadas con los primers B4-B5 mostró 100% de identidad respecto de *B. abortus* 2308 bv1 y *B. abortus* C19.

Mediante RT-PCR los primers B4-B5 amplificaron productos con una temperatura de disociación (T_m) de $87,5 \pm 0,5$ °C, semejante a la de los productos de las cepas de referencia (Figura 10). Resultaron positivos para el gen *omp31* por RT-PCR, 7 de 35 muestras bubalinas (20%) y 22 de 23 (95,6%) muestras bovinas.

Figura 10. RT-PCR del gen *omp31*, mediante los primers B4-B5.

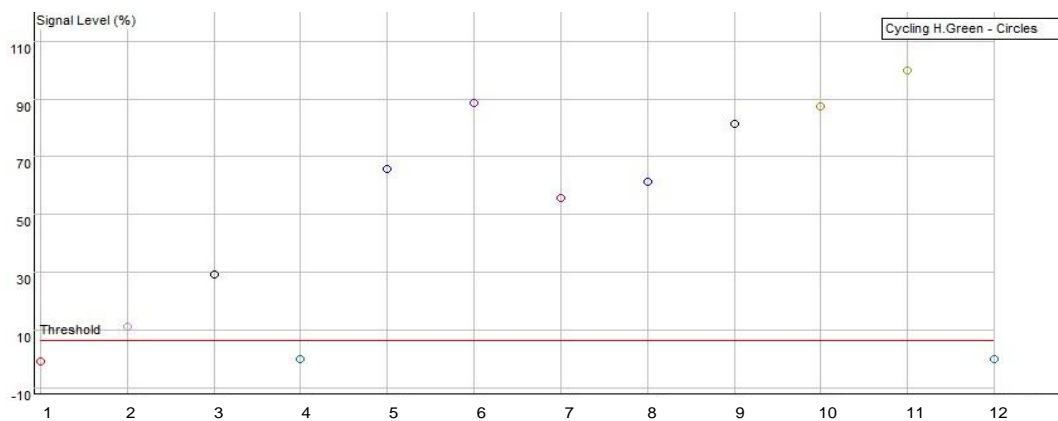
A. Curva de disociación del ADN.



B. Temperatura de disociación o “melting” (T_m)

B4-B5	ID	Genotipo	T _m
Búfalos	1		-
	2		87,6
	3		87,5
	4		-
Bovinos	5		87,5
	6		87,3
	7		87,5
	8		87,5
	9		87,5
<i>B. abortus</i> bv 1	10	<i>Brucella</i> spp	87,5
<i>B. abortus</i> C19	11	<i>Brucella</i> spp	87,5
Muestra sin ADN	12		-

C. Porcentaje de fluorescencia emitida.

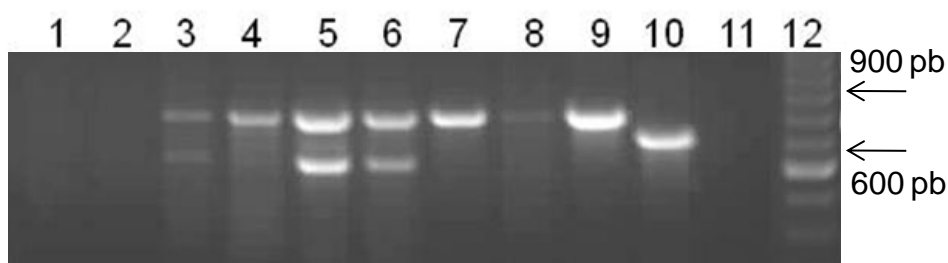


3.2.2.1.2. Gen *omp2ab*

3.2.2.1.2.1. Primers DSF - DSR2

Se amplificaron fragmentos de tamaño variable entre 600 y 900 pb de una región polimórfica del gen *omp2ab* en 18 de 23 muestras bovinas (78,26%) de la provincia de Formosa y 2 de 35 muestras bubalinas (5,71%) de la misma provincia (Figura 11).

Figura 11. Amplificación de fragmentos de tamaño variable del gen *omp2ab* mediante los primers DSF- DSR2 en bovinos y búfalos.



Calles 1-6 muestras de bovinos; calles 7 y 8, muestras de búfalos; calle 9, *B. abortus* bv 1; 10, *B. abortus* C19; 11, control negativo; 12, marcador molecular de 100 pb (Promega®).

El análisis de las diferentes secuencias correspondientes al fragmento de 719 pb confirmó la especificidad de género (*Brucella* spp.) con un 100% de identidad respecto de la secuencia de *B. abortus* cepa 2308 bv1. El análisis de las secuencias de 857 pb mostró 100% de identidad con las de *B. abortus* bv5 y *B. melitensis* depositadas en el GenBank. Las muestras pertenecían a bovinos y bubalinos de Formosa, de tres rodeos bovinos de Pirané (n=2), de Patiño (n=1) y uno de búfalos también de Pirané. Se identificó también *B. abortus* cepa 19 (Figura 12).

Por primera vez en Argentina se identifica *B. abortus* bv 5.

Figura 12. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas amplificadas con los primers DSF-DSR2 en muestras de ADN obtenido de sangre de bovinos y bubalinos.

```

B.melitensis      CGCTCAGGCTGCCGACGCAATCGTCGCGCCAGAGCCCGAAGCCGTTGAATATGTCGCGGTTTGGCAGCCTTACGGCGCTG 80
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      GCTACTTCTACATTCCGGGACCAGAACTGCCTGCGCTCCATGGTTACGTCCGTTACGACGTAAGGGCGCGGATGAC 160
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      GTTTACTCCGGTACCGACCGCAATGGCTGGGACAAGGGCGCTCGTTTCGCACCTCATGTTCAACACGAATTCGGAACCGA 240
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      ACTCGGCACACTCGGCACCTATACTCAGCTGCGCTTCAACTACACCAGCAACAATTCACGTCATGATGCCAATACGCGC 320
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      ATTTACGCGATGATCGTGATGTCGCTGATGGCGGCGTAAGCACCAGCCGATCTGCAGTTTGCATATATCAGCGTTGGT 400
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      GGTTTCAAGGTTGGTATCGACGAATCCGAATCCATACCTTACCCGGTATGTCATCAACGATGATGTCGT 480
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      CGCTGCTGGCTCCTACCGCACCGCAAGATCGCCTACACCTTACCAGCGGAAACGGCTTCTCGGCTGTGATCGCTCTCG 560
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      AACAGGGTGGCGAAGACGTTGACAACGATTACACGATCGACGGTTACATGCCGCACGTTGTTGGCGGCTGAAATATGCT 640
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

B.melitensis      GCGCGCTGGGGTTCGATCGCTGGTGTGTTGCCTATGACTCGGTCATCGAAGAATGGGCTACAAAGGTTTCGTGGCGACGT 720
B.abortus        bv5 .....
09-5065 bovino   .....
18-5234 bovino   .....
44-5198 bovino   .....
53-5346 búfalo   .....
B.abortus 2308   bv1 .....
B.abortus C19    bv1 .....
B.abortus RN1    bv1 .....

```



```

B.melitensis      CAACATCACCGACCGGTTCTCGGTATGGTGCAGGGCGCATATTCGTCCGCAGCGACCGAACCACTACGGTCAGT 800
B.abortus      bv5 ..... 800
09-5065 bovino ..... 800
18-5234 bovino ..... 800
44-5198 bovino ..... 800
53-5346 búfalo ..... 800
B.abortus 2308 bv1 ..... 662
B.abortus C19 bv1 ..... 662
B.abortus RN1 bv1 ..... 662

B.melitensis      GGGGCGGCGATTGGGCTGTCTGGGGTGGTGCAAAGTTCATTGCCCCGAAAAGGCAA 857
B.abortus      bv5 ..... 857
09-5065 bovino ..... 857
18-5234 bovino ..... 857
44-5198 bovino ..... 857
53-5346 búfalo ..... 857
B.abortus 2308 bv1 ..... 719
B.abortus C19 bv1 ..... 719
B.abortus RN1 bv1 ..... 719

```

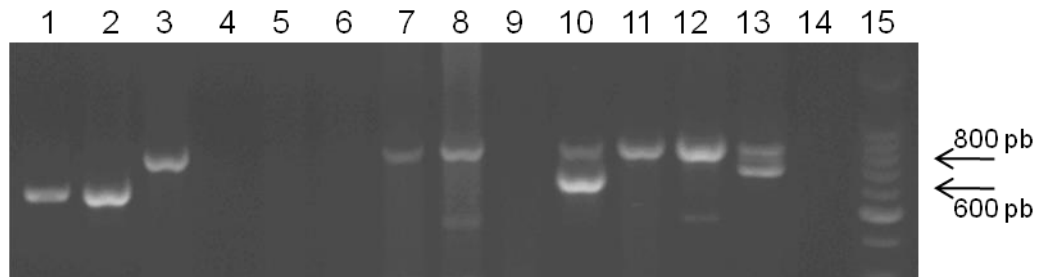
Se utilizaron las secuencias de *B. melitensis* (GenBank U26440.1) *B. abortus* 2308 bv1 (Genbank AM040264.1). *B. abortus* bv5 (GenBank U26438.1) *B. abortus* cepa 19 (GenBank CP000887.1).

B. abortus bv5 presentó una inserción de 139 pb respecto de *B. abortus* bv1.

3.2.2.1.2.2. Primers DSF - DSR

Se amplificaron fragmentos únicos o dobles, que variaron entre aproximadamente 600 y 800 pb de una región más acotada del gen *omp2ab*, en 17 de los 23 (73,9%) bovinos y 4 en de los 35 (11,42%) bubalinos analizados, todos provenientes de la provincia de Formosa. De las muestras de origen bovino, 16 tuvieron una banda única de aproximadamente 800 pb y 1 exhibió doble banda. Las 4 muestras bubalinas exhibieron doble banda. Otras muestras bubalinas presentaron fragmentos de menor tamaño al esperado (Figura 8).

Figura 13. Amplificación de fragmentos de ~ 600 a 800 pb del gen *omp2ab* con primers DSF-DSR.



Calles 1-2, muestras de búfalos; 3-12, muestras de bovinos; 13, *Brucella abortus* bv 1; 14, Control negativo; 15, marcador molecular de 100 pb (Promega®).

El análisis de las secuencias mostró 100% de similitud con *B. abortus* bv5 y *B. melitensis* en un bovino de Pirané en la provincia de Formosa (Figura 14).

Las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados de menor tamaño fueron inespecíficas.

Figura 14. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas amplificadas con los primers DSF-DSR en un bovino.

```

B. melitensis GCGCTCAGGCTGCCGACGCAATCGTCGCGCCAGAGCCCCAAGCCGTTGAATATGTCCGCGTTGCGACGCTTACGGCGCT 80
B. abortus bv5 ..... 80
9- 5065 bovino ..... 80

B. melitensis GGTACTTCTACATTCCGGGCACCGAAACCTGCCTGCGCGTCCATGGTTACGTCCGTTACGACGTAAGGGCGGCGATGA 160
B. abortus bv5 ..... 160
9- 5065 bovino ..... 160

B. melitensis CGTTTACTCCGGTACCGACCGCAATGGCTGGGACAAGGGCGCTCGTTTCGCACCTCATGTTCAACACGAATTCGGAACCG 240
B. abortus bv5 ..... 240
9- 5065 bovino ..... 240

B. melitensis AACTCGGCACACTCGGCACCTATACTCAGCTGCGCTTCAACTACCCAGCAACAATTCACGTCATGATGGCCAATACGGC 320
B. abortus bv5 ..... 320
9- 5065 bovino ..... 320

B. melitensis GATTTACGCGATGATCGTGATGTCGCTGATGGCGCGTAAGCACCAGCACCATCTGCAGTTTGCATATATCAGCTTGG 400
B. abortus bv5 ..... 400
9- 5065 bovino ..... 400

B. melitensis TGGTTTCAAGGTTGGTATCGACGAATCCGAATCCATACCTTACCAGGTTACCTCGGTGATGTCATCAACGATGATGTCG 480
B. abortus bv5 ..... 480
9- 5065 bovino ..... 480

B. melitensis TCGTGCTGGCTCCTACCGCACCGCAAGATCGCCTACACCTTACCAGGCGGAAACGGCTTCTCGGCTGTGATCGCTCTC 560
B. abortus bv5 ..... 560
9- 5065 bovino ..... 560

B. melitensis GAACAGGTGGCGAAGACGTTGACAACGATTACACGATCGACGGTTACATGCCGCACGTTGTTGGCGGCTGAAATATGC 640
B. abortus bv5 ..... 640
9- 5065 bovino ..... 640

B. melitensis TGGCGGCTGGGGTTCGATCGCTGGTGTGTTGCCTATGACTCGGTTCATCGAAGAAATGGGCTACAAAGTTTCGTGGCGACG 720
B. abortus bv5 ..... 720
9- 5065 bovino ..... 720

B. melitensis TCAACATCACCGACCGGTTCTCGGTATGGCTGCAGGGCGCATATTCGTCAGCAGCAGCCGAAACCAGAACTACGGTCAG 800
B. abortus bv5 ..... 800
9- 5065 bovino ..... 800

B. melitensis TGGGGCGGCGATTGGGCTGTCTGGGGT 827
B. abortus bv5 ..... 827
9- 5065 bovino ..... 827

```

Se utilizaron las secuencias de *B. melitensis* (GenBank U26440.1) y *B. abortus* bv5 (GenBank U26438.1)

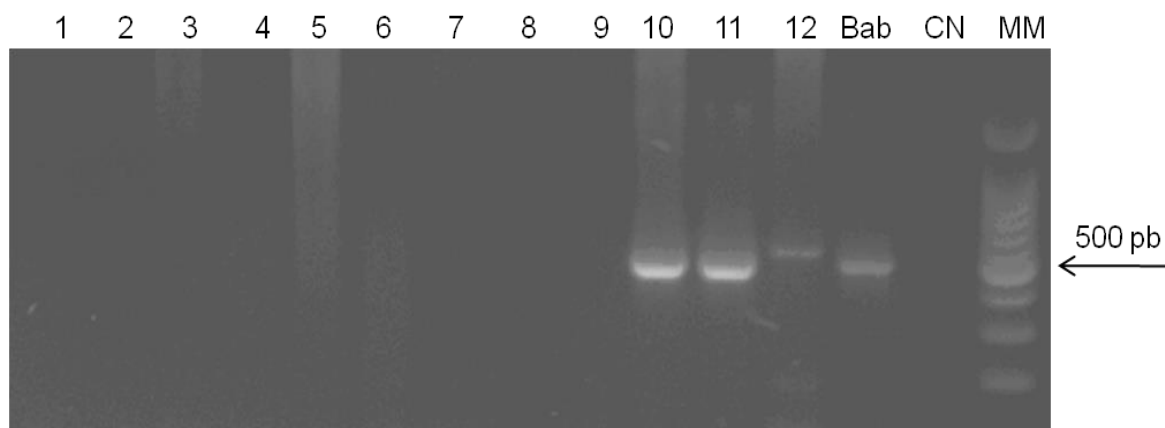
No se logró amplificación del gen *omp2ab* con ninguno de los dos juegos de primers en bubalinos de la provincia de Corrientes.

3.2.2.1.3. Región *IS711* - gen *alkB*

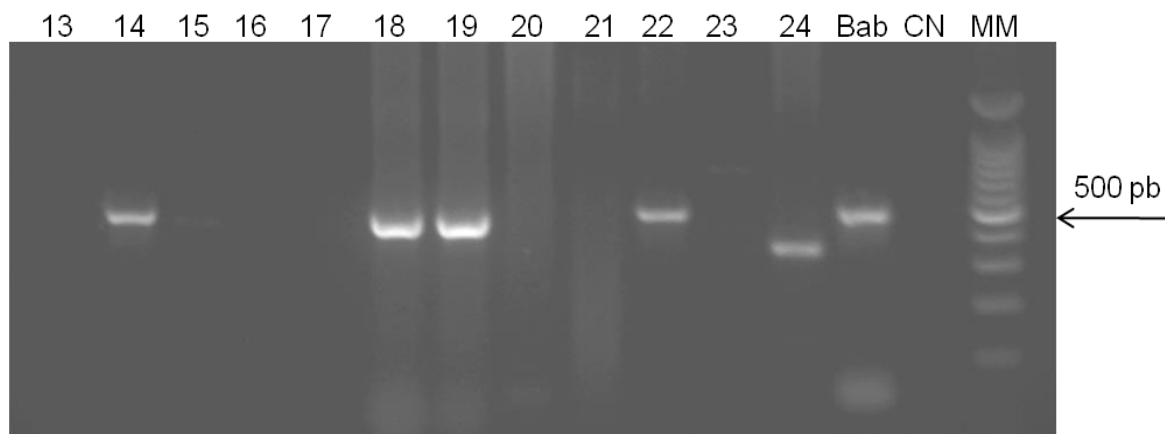
Los primers *IS711R*-416F amplificaron un fragmento del tamaño esperado (498 pb) en 6 búfalos (17,14%) y en 11 bovinos (47,82%) de la provincia de Formosa (Figura 15).

Figura 15. Amplificación de fragmentos de ~ 498 pb de la región comprendida entre el inserto *IS711* y el gen *alkB* en búfalos y bovinos.

A. Búfalos



B. Bovinos



Calles 1-12, muestras bubalinas; calles 13-24, muestras bovinas; Bab, *B. abortus* bv 1; CN, control negativo; MM, marcador molecular de 100 pb (Promega®).

Las secuencias analizadas de los fragmentos amplificados de bovinos y búfalos fueron específicas de especie (*B. abortus*), y mostraron 100% de identidad con las de *B. abortus* 2308 y C19 depositadas en el GenBank (Figura 16).

Figura 16. Alineamiento de las secuencias de un fragmento comprendido entre el inserto *IS711* y el gen *alkB* mediante análisis Blast en la base de datos GenBank.

```

B.abortus 2308 bvl GACGAACGGAAATTTTCCCAATCCCATCGTTTCCGTTTCACCTGGCCTGCCGGCAACGTTTCAGTTTGGCGGAATGAAACG 80
B.abortus C19 bvl ..... 80
23 -5318 bovino ..... 80
121-5346 búfalo ..... 80

B.abortus 2308 bvl GACGGACCCGATCACCAAAATATATCCATGACCATGGCGACGTGGTTGTCTGGGGCGGGCCGTCGCGGCTTTTCTATCAG 160
B.abortus C19 bvl ..... 160
23 -5318 bovino ..... 160
121-5346 búfalo ..... 160

B.abortus 2308 bvl GTATTCTACCAATTGAAGTCTGGCGAGCATGAGCGGCTGGGGCCGTTTCGGCTTAATCTGACCTTCCGAAAGGCGTTCTAG 240
B.abortus C19 ..... 240
23 -5318 bovino ..... 240
121-5346 búfalo ..... 240

B.abortus 2308 bvl GGCGTGTCTGCATTTAACGTAACCCAGATCATAGCCATGCGAGATGGACGAAACCCATGAATGCGGTCAATGTTTCTCG 320
B.abortus C19 bvl ..... 320
23 -5318 bovino ..... 320
121-5346 búfalo ..... 320

B.abortus 2308 bvl CATCGCAGCGCAATACGACGATAGCGTTTCAACTTGTAAAAAAGCATTCAATCTGATGGCGTTCCTTGTACAGCCTCCA 400
B.abortus C19 bvl ..... 400
23 -5318 bovino ..... 400
121-5346 búfalo ..... 400

B.abortus 2308 bvl GTCGATTGTTGGGGCACTGGAACGTGTGGATTGACCTTGATCTGAGCCGTTGCCTTGAGATCGCTGGCAATGAAGGCC 480
B.abortus C19 bvl ..... 480
23 -5318 bovino ..... 480
121-5346 búfalo ..... 480

B.abortus 2308 bvl TTAAGTGATCGGCA 494
B.abortus C19 bvl ..... 494
23 -5318 bovino ..... 494
121-5346 búfalo ..... 494

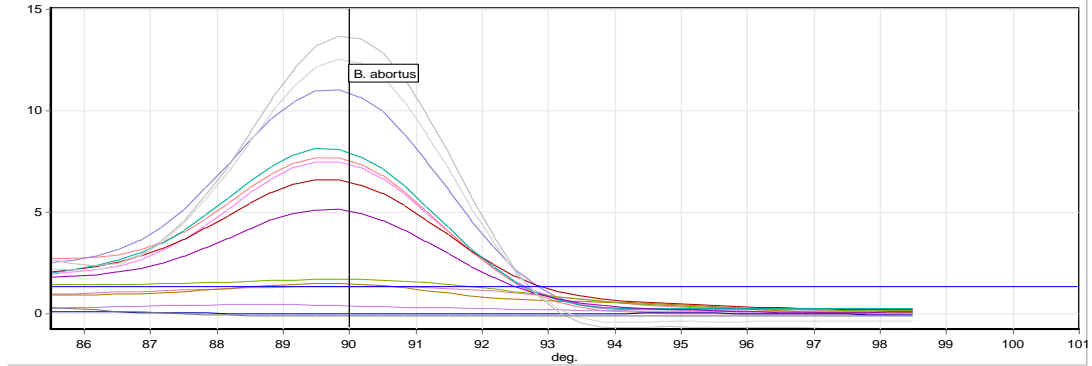
```

Se utilizaron las secuencias de *B. abortus* 2308 (GenBank CP AM040265.1) y *B. abortus* C19 (GenBank CP 000888.1)

Los productos amplificados de la región comprendida entre el inserto *IS711* y el gen *alkB* por RT-PCR mostraron una temperatura de disociación (T_m) de $87,5 \pm 0,5$ °C, igual a la de los productos de las cepas de referencia (Figura 17). Resultaron positivas 3 de 35 muestras bubalinas (8,57%) y 10 de 23 (43,47%) muestras bovinas.

Figura 17. RT-PCR de IS711- gen *alkB*, mediante los primers IS711 – 416F.

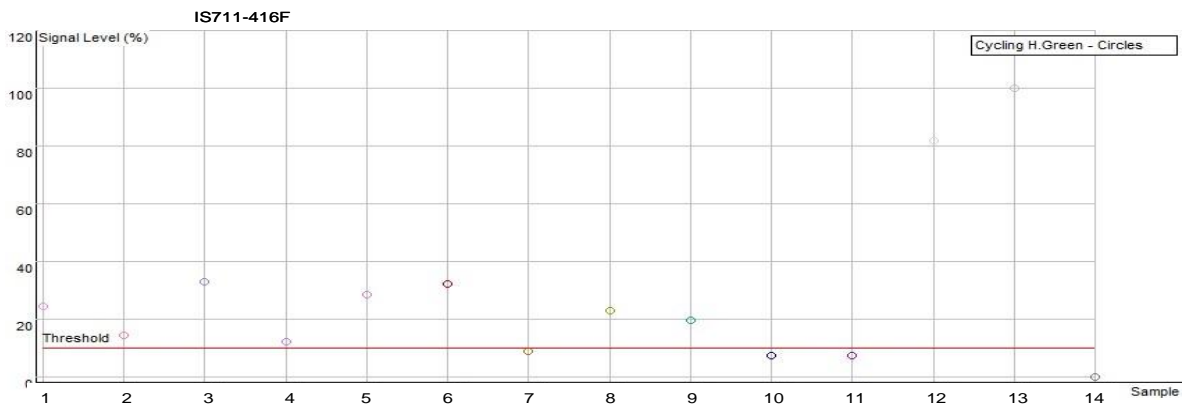
A. Curva de disociación del ADN.



B. Temperatura de disociación o “melting” (Tm).

IS711-416F	ID	Genotipo	Tm
Búfalos	1		89,7
	2		89,7
	3		89,7
	4		-
Bovinos	5		89,7
	6		89,7
	7		90
	8		-
	9		89,7
	10		90
	11		-
<i>B. abortus</i> bv 1	12	<i>B. abortus</i>	90
<i>B. abortus</i> C19	13	<i>B. abortus</i>	90
Muestra sin ADN	14		-

C. Porcentaje de fluorescencia emitida.

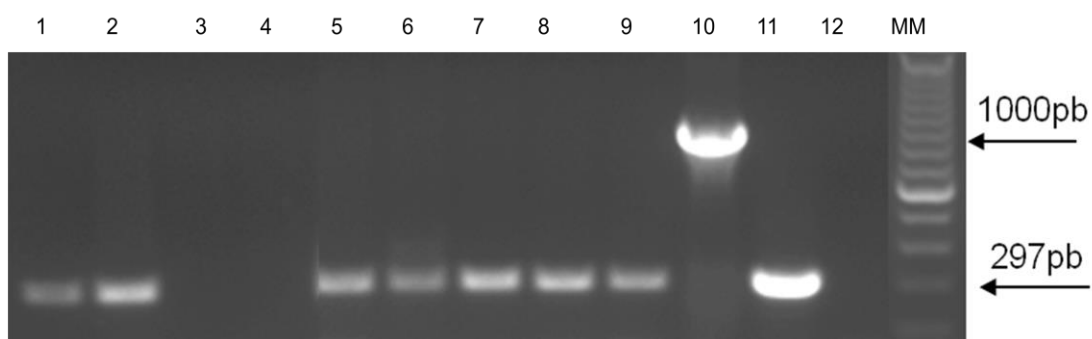


3.2.2.1.4. Gen *eri*

Los primers Eri1-Oligo2 amplificaron dos fragmentos de aproximadamente 297 y/o 1000 pb de una región del gen *eri* de *Brucella* spp. en 11 de 35 búfalos (47,82%) y en 20 de 23 bovinos (86,95%). Una única banda de 297 pb fue identificada en búfalos de Corrientes. En búfalos y bovinos de Formosa se detectaron bandas únicas de 297 pb, 1000 pb o ambas bandas simultáneamente (Figura 18).

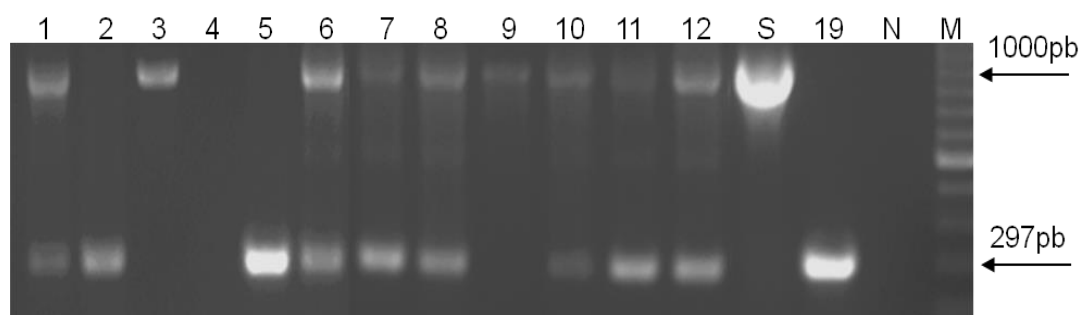
Figura 18. Amplificación de fragmentos de ~ 297 y 1000 bp del gen *eri* con primers Eri1-Oligo2 en muestras de búfalos y de bovinos.

A. Búfalos de la provincia de Corrientes



Calles 1-9, muestras de sangre bubalinas; 10, *Brucella* RN1 bv1; 11, *B. abortus* cepa 19; 12, control negativo; MM, marcador molecular de 100 pb (Promega).

B. Bovinos y búfalos de la provincia de Formosa



Calles 1-9, muestras de sangre bovinas; calles 10-12, muestras de sangre bubalinas; S, *Brucella* RN1 bv1; 19, *B. abortus* cepa 19; N, control negativo; M, marcador molecular de 100 pb (Promega®).

El análisis de las secuencias mostró 100% de similitud entre los fragmentos de 297 pb y de 1000 pb con las secuencias de *B. abortus* C19 y *B. abortus* 2308, respectivamente, depositadas en GeneBank (Figura 19).

Figura 19. Alineamiento de las secuencias de 297 y 1000 pb del gen *eri* mediante análisis Blast de la base de datos de GenBank.

```

B.abortus 2308 bv1 GCGCCGCGAAGAACTTATCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAGGTGCGGGCCTCGACT 80
B.abortus RN1 bv1 ..... 80
86a-5358 ..... 80
144-5128 ..... 80
B.abortus C19 ..... 80
53 -5346 ..... 80
86b-5358 ..... 80

B.abortus 2308 bv1 ATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAAATTTGGCGAGACGATTGCCAATGCATGAAGCTTCAGGATCGGCTC 160
B.abortus RN1 bv1 ..... 160
86a-5358 ..... 160
144-5128 ..... 160
B.abortus C19 ..... GAAGCCCTGCCGCTG...GC...GGCC...GC.GG. 160
53 -5346 ..... GAAGCCCTGCCGCTG...GC...GGCC...GC.GG. 160
86b-5358 ..... GAAGCCCTGCCGCTG...GC...GGCC...GC.GG. 160

B.abortus 2308 bv1 ACCGCCGCTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGGCCGATATCGACCATGGTACGTCGACATCCGCTAACCCGGACGA 240
B.abortus RN1 bv1 ..... 240
86a-5358 ..... 240
144-5128 ..... 240
B.abortus C19 G.GAATTC.TGCGCCGCGAAAT.GAACATGGCGATCAT..GG..AT.GGCATC.G.CATGGCCG.A.ACTTT...CA.C 240
53 -5346 G.GAATTC.TGCGCCGCGAAAT.GAACATGGCGATCAT..GG..AT.GGCATC.G.CATGGCCG.A.ACTTT...CA.C 240
86b-5358 G.GAATTC.TGCGCCGCGAAAT.GAACATGGCGATCAT..GG..AT.GGCATC.G.CATGGCCG.A.ACTTT...CA.C 240

B.abortus 2308 bv1 CTACGATCCCTACGCAATGGGCCGACCCGTGCCGAAAGTCTCGCCCATCATCCATATCAAGCAAAGCCATGATGGACAAGG 320
B.abortus RN1 bv1 ..... 320
86a-5358 ..... 320
144-5128 ..... 320
B.abortus C19 GGTT.G.TA.ATGC.GC.T.T.ATGG..AATGATCTGCGT.TCGT.TCGC.T.TGGG 297
53 -5346 GGTT.G.TA.ATGC.GC.T.T.ATGG..AATGATCTGCGT.TCGT.TCGC.T.TGGG 297
86b-5358 GGTT.G.TA.ATGC.GC.T.T.ATGG..AATGATCTGCGT.TCGT.TCGC.T.TGGG 297

B.abortus 2308 bv1 GCGGGCATCGTCCCTTACAGCCGCTTCAATGCCAAGGGCCGCATCCAGCCGGAACCGCTTTGAAAGCCTTTGCCGAA 400
B.abortus RN1 bv1 ..... 400
86a-5358 ..... 400
144-5128 ..... 400
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 GGCGCCGCGGTGGATAATGAAATCTGCCTTGAACCTTCTCAAGGAGCGCGAGCCGAACGCGTGAAGTCATTCCACA 480
B.abortus RN1 bv1 ..... 480
86a-5358 ..... 480
144-5128 ..... 480
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 GATTGCAGAAAGTGTGGCTTCTGGGCCCGCACATTGACACCGCGCTAAGGACTTGAAGATATAGGAAATTTCCAGAA 560
B.abortus RN1 bv1 ..... 560
Brucella spp búfalo ..... 560
86a-5358 ..... 560
144-5128 ..... 560
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 CCGGACCGCGTTCAATGGCAGATGCAGACGATTCTCTGGCGCTTCGCGCCGCTGGCTTCATTTCGTCGCCGCATGACT 640
B.abortus RN1 bv1 ..... 640
86a-5358 ..... 640
144-5128 ..... 640
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 CAGTCTGCCGTTGCCAAGCGCCTTGGCCTGCCTTCGGTGAAGCGCATCGTCTCATCGCCAAGGCCGTTGCCGACGGCC 720
B.abortus RN1 bv1 ..... 720
86a-5358 ..... 720
144-5128 ..... 720
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

```

```

B.abortus 2308 bv1 GGTGAAAGTGACCATCGACGGTGACATCACCGAATGCATCGATCTGGAAAACCGTCTGGCCGATCTTTACGGCCTCGATT 800
B.abortus RN1 bv1 ..... 800
86a-5358 ..... 800
144-5128 ..... 800
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 ATTGCGAGGTCGCACCCGATATTGGCGAGGAAGGCCCTGCCGCTGATGGCGCTTGCCATGCGGGCGCGAATTCATGCGC 880
B.abortus RN1 bv1 ..... 880
86a-5358 ..... 880
144-5128 ..... 880
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 CGCGAAATCGAACATGGCGATCATGAGGTTCATCGGCATCGGCCATGGCCGCACACTTTCGGCAGCGGTTGGTTATATGCC 960
B.abortus RN1 bv1 ..... 960
86a-5358 ..... 960
144-5128 ..... 960
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

B.abortus 2308 bv1 GCGTGTTCATGGCCAATGATCTGCGTTTCGTCTCGCTTCTGGG 1002
B.abortus RN1 bv1 ..... 1002
Brucella spp búfalo ..... 1002
86a-5358 ..... 1002
144-5128 ..... 1002
B.abortus C19 ..... 297
53 -5346 ..... 297
86b-5358 ..... 297

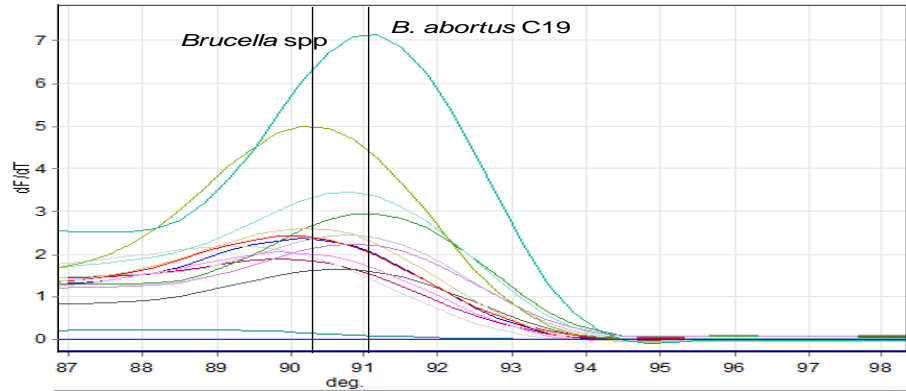
```

Se utilizaron las secuencias de *B. abortus* 2308 (GenBank X78881.1), de la cepa de referencia RN1, de la cepa de *Brucella* aislada de búfalo y *B. abortus* C19 (GenBank CP 000888.1)

La temperatura de disociación (T_m) fue de $90,3 \pm 0,5$ para *Brucella* spp. silvestre y $91 \pm 0,5$ °C para *B. abortus* C19 (Figura 20). Los productos amplificados mostraron valores incluidos dentro de estos rangos de T_m . Resultaron positivas para el gen *eri* por RT-PCR, 4 de 35 muestras bubalinas (11,42%) y 12 de 23 (52,17%) muestras bovinas, aunque no fue posible discriminar la C 19 de *B. abortus* silvestre debido a la superposición de los valores de T_m .

Figura 20. RT-PCR del gen *eri*, mediante los primers Eri1- Oligo2.

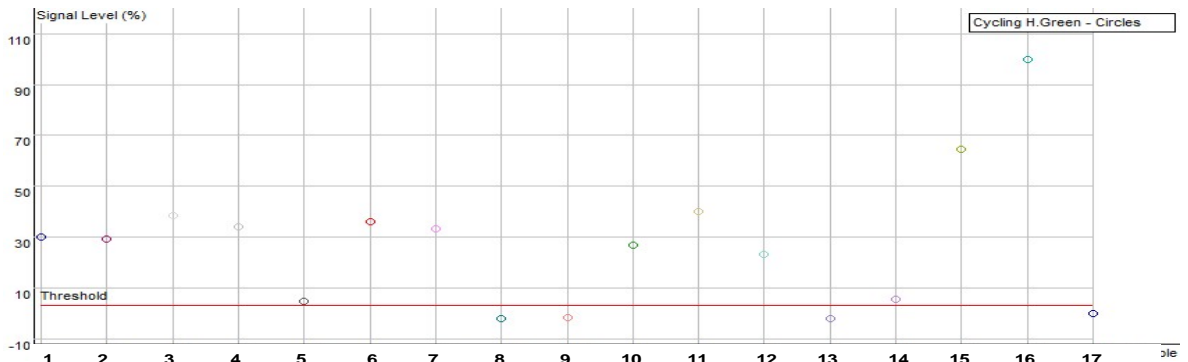
A. Curva de disociación del ADN.



B. Temperatura de disociación o “melting” (Tm).

Eri1-Oligo2	ID	Genotipo	Tm	
Bovinos	1		90,2	
	2		90	
	3		89,2	
	4		90,8	
	6		90	
	7		90	
	8		-	
	9		-	
	11		90,2	
	Búfalos	5		90,7
		10		91
12			90,7	
13			-	
14			90,8	
Muestra sin ADN	15			
<i>B. abortus</i> C19	16	<i>B. abortus</i> C19	91	
<i>B. abortus</i> bv 1	17	<i>Brucella</i> spp	90,3	

C. Porcentaje de fluorescencia emitida.



Se logró identificar *B. abortus* C19 en rodeos de búfalos y bovinos de Formosa y en búfalos de Corrientes (Figura 20 A y B). *B. abortus* silvestre bv1 y bv5 fueron identificadas sólo en Formosa. En esta misma región se logró localizar la procedencia de una cepa de *Brucella* spp. aislada previamente de un feto bubalino abortado y tipificada en el presente trabajo como *B. abortus* bv5 (Figura 20 A). La eficiencia de la PCR para amplificar ADN de *Brucella* spp. de animales positivos a FC osciló entre 11,4% y 23% para búfalos y de 47,8% y 73,9% para bovinos. La combinación de los primers fue indispensable para llegar a la identificación molecular de *Brucella* spp (Tabla 19).

Tabla 19. Epidemiología molecular de *Brucella* spp. en bovinos y búfalos del NE Argentino.

RODEOS		PCR															
Provincia	Dpto.	Rodeo	Positivos serología n %	Positivos para cada par de primers (n)										Especie y biovar Secuenciación			
				B4-B5		DSF-DSR		DSF-DSR2		E711-416		Eri1-Oligo2			Especie (PCR)	PCR	
Búfalos		B4-B5	DSF-DSR	DSF-DSR2	E711-416	C19	Silvestre	C19/Silvestre	Eri1-Oligo2		Especie y biovar Secuenciación						
		Total de muestras (n)							C19	Silvestre		C19/Silvestre	Eri1-Oligo2		Especie y biovar Secuenciación		
		Itatí	E2	7	37%	1	0	0	0	2	0	0	0	0		<i>B. abortus</i> C19	bv 1
		Gral. Paz	E6	1	6,60%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	-	<i>B. abortus</i>
		Empedrado	E7	6	4%	0	0	0	0	1	0	0	0	0	<i>B. abortus</i> C19	bv 1	<i>B. abortus</i>
	Corrientes	Gral. Paz	E8	3	2,40%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	-	<i>B. abortus</i>
		Gral. Paz	E9	6	6,30%	2	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Brucella</i> spp.	Nla	<i>Brucella</i> spp.
		Esquina	E11	4	12%	1	0	0	0	4	0	0	0	0	<i>B. abortus</i> C19	bv 1	<i>B. abortus</i> C19
		Patúño	E13	4	4,30%	0	0	0	2	0	0	0	0	0	<i>B. abortus</i>	Nic	<i>B. abortus</i>
		Patúño	E25	3	7%	1	1	1	1	0	0	1	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/bv 1	<i>B. abortus</i>
		Pirané	E26	7	2,80%	3	3	3	3	1	0	2	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/bv 1/bv 5	<i>B. abortus</i> bv 5
		TOTAL		35		8	4	4	6	8	0	3	0	0			
		PORCENTAJE		100,0%		22,8%	11,4%	11,4%	17,1%	22,8%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%			
		Bovinos															
		Pirané	E14	44	30,60%	11	6	8	7	3	3	2	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/bv 1/bv 5	<i>B. abortus</i> / <i>B. abortus</i> bv 5
		Pilcomayo	E15	4	2,50%	2	2	2	1	1	0	1	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/bv 1	<i>B. abortus</i>
		Pirané	E16	14	4,70%	2	1	2	1	0	1	1	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/bv 1	<i>Brucella</i> spp.
		Pirané	E17	1	0,50%	1	1	1	1	0	0	1	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/Nlb	<i>Brucella</i> spp.
		Patúño	E18	b	3%	1	1	1	1	0	0	1	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/Nlb	<i>B. abortus</i>
		Patúño	E19	1	1%	1	1	1	0	0	1	0	0	0	<i>B. abortus</i> silv.	bv 5?	<i>B. abortus</i> bv 5
		Laisihí	E20	1	2,80%	1	1	1	0	0	1	0	0	0	<i>B. abortus</i> silv.	bv 5?	<i>B. abortus</i> bv 5
		Patúño	E21	2	1,20%	1	1	1	0	0	1	0	0	0	<i>B. abortus</i> silv.	bv 5?	<i>B. abortus</i> bv 5
		Laisihí	E22	2	9,50%	1	1	1	0	0	0	1	0	0	<i>B. abortus</i> C19/ <i>B. abortus</i> silv.	bv 1/Nlb	<i>B. abortus</i> C19/ <i>Brucella</i> spp.
		Pirané	E23	2	1,40%	1	1	1	0	0	1	0	0	0	<i>B. abortus</i> silv.	bv 5?	<i>B. abortus</i>
		Fomosa	E24	2	6,10%	1	1	1	0	0	1	0	0	0	<i>B. abortus</i> silv.	bv 5?	<i>B. abortus</i>
		TOTAL		23		23	17	17	11	4	9	7	0	0			
		PORCENTAJE		100,0%		73,9%	73,9%	47,8%	47,8%	17,4%	39,1%	30,4%	0,0%	0,0%			

3.2.2.2. Evaluación de PCR para identificar *Brucella* spp. en muestras de sangre de búfalos positivos y negativos a FC provenientes de un mismo rodeo

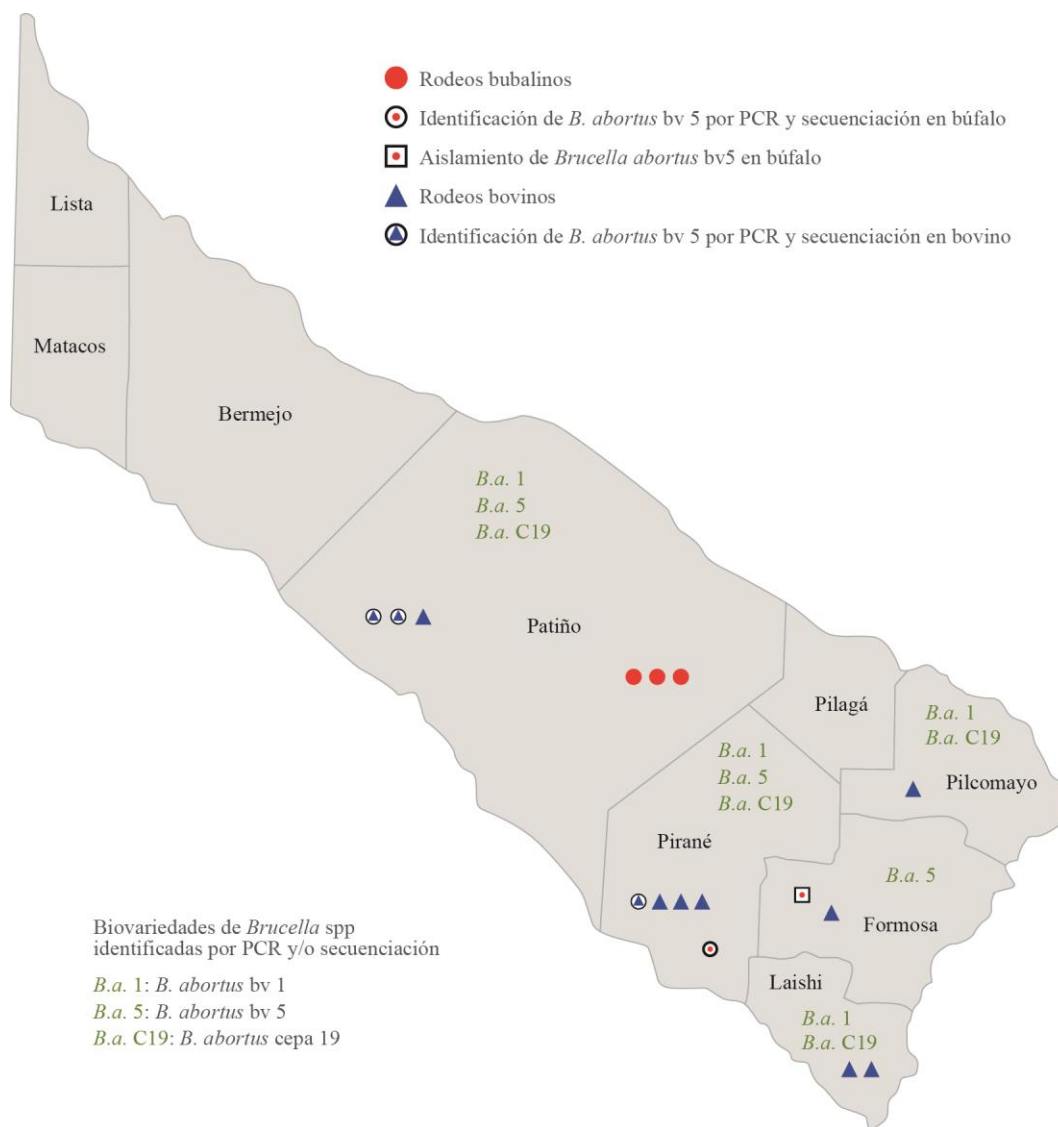
A través de PCR y RT-PCR se logró identificar *B. abortus* cepa 19 en búfalos serológicamente positivos y negativos de un establecimiento ubicado en el departamento Esquina de la provincia de Corrientes, que presentó una prevalencia serológica de 12% (Tabla 20). Cuatro animales que evidenciaron títulos de anticuerpos de 165 UIFC (n=2) y 1323 UIFC (n=2), también positivos a las pruebas de ELISA-c y FPA, amplificaron, con los primers Eri1-Oligo2, la secuencia de 297 pb, específica para *B. abortus* cepa 19. Dicha secuencia fue también amplificada en 9 búfalos negativos a las pruebas serológicas en el mismo rodeo. La presencia de *B. abortus* cepa 19 fue confirmada mediante el análisis de las secuencias de 8 muestras (datos no mostrados). Mediante RT-PCR se identificó ADN de *B. abortus* cepa 19 en 15 de 17 animales (88,2%). No se identificó *B. abortus* silvestre.

Tabla 20. Amplificación por PCR/RT-PCR y caracterización molecular de secuencias específicas para *Brucella* spp. en muestras de búfalos positivos y negativos a FC provenientes de un mismo rodeo.

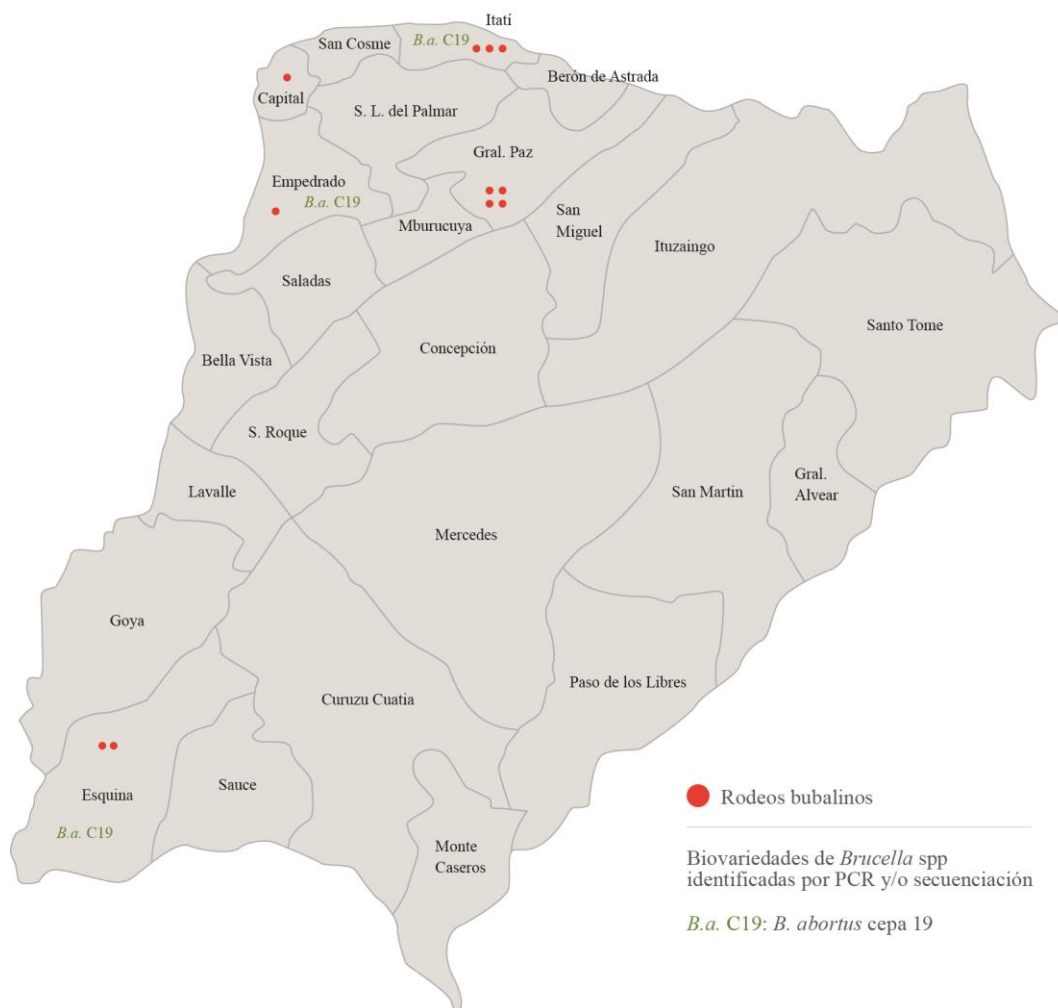
Rodeo ID	Búfalos analizados (n)	POS (%)	ID	Serología			PCR (pb)				RT-PCR (Tm)	Secuenciación		
				FC (UIFC)	ELISA-c (%P)	FPA UmP	B4-B5	416-IS711	Eri1-Oligo2	Br1-Br4	Eri1-Oligo2			
E11	33	4 (12%)	15	N			N	N	297	N	92,3	<i>B. abortus</i> C 19		
			16	N			N	N	297	N	92			
			17	N			N	N	N	N	92,2			
			24	N			N	N	297	N	92		<i>B. abortus</i> C 19	
			26	N					N	N	297	N	92,2	<i>B. abortus</i> C 19
			27	N					N	N	297	N	92	<i>B. abortus</i> C 19
			28	165	84	134	N	N	297	N	92	<i>B. abortus</i> C 19		
			29	N					N	N	297	N	92	
			30	165	41	120	N	N	297	N	92,2	<i>B. abortus</i> C 19		
			31	N					N	N	297	N	92	<i>B. abortus</i> C 19
			32	1323	97	184	N	N	297	N	92,2	<i>B. abortus</i> C 19		
			33	N					N	N	297	N	92,2	
			34	N					N	N	N	N	92,3	
			41	N					223	N	N	N	92,3	<i>Brucella</i> spp
			42	N					N	N	297	N	92,3	
			43	N					223	N	N	N	N	<i>Brucella</i> spp
			45	1323	98	188	223	N	297	N	N	N	<i>Brucella</i> spp	

Figura 20. Localización de los rodeos donde se identificó *B. abortus* por PCR y/o secuenciación. Procedencia de *B. abortus* bv5 aislada de un feto bubalino abortado y tipificada en el presente trabajo.

A. Formosa



B. Corrientes



3.2.2.3. Caracterización molecular de *Brucella* spp. a partir de muestras clínicas diferentes de sangre en búfalos positivos a FC

En las muestras de leche se logró identificar *B. abortus* cepa 19, mientras que en los productos amplificados a partir de hisopados articulares y órganos de fetos, sólo pudo identificarse el género *Brucella* spp. con los primers B4-B5. No hubo amplificación con los otros pares de primers usados (Tabla 21).

Tabla 21. Cantidad de positivos a PCR sobre las muestras clínicas tomadas de búfalos serológicamente positivos a brucelosis y caracterización molecular de las cepas encontradas.

Especímen	n	Primers			Caracterización	
		B4-B5	IS711 -412R	Eri1-Oligo2	PCR	Secuenciación
Leches	12	2	0	4	<i>Brucella</i> spp./ <i>B. abortus</i> C19	<i>B. abortus</i> C19
Hisopados y órganos	43	2	0	0	<i>Brucella</i> spp.	<i>Brucella</i> spp.

3.2.2.4. Cultivos

No se logró el aislamiento de *B. abortus* a partir de las muestras biológicas bubalinas obtenidas a campo y en frigorífico durante el desarrollo del trabajo.

3.3. Caracterización biológica y molecular de una cepa de *Brucella* spp aislada a partir de un feto abortado de una búfala de Formosa

3.3.1. Tipificación bacteriológica

La bacteria aislada del abomaso de un feto abortado de una búfala de Formosa fue identificada como *Brucella* spp. en base a las características de las colonias y a la coloración de Gram (INTA Mercedes Corrientes).

Brucella spp mostró características diferentes a la cepa de *B. abortus* RN1 bv1 cuando se la evaluó en cultivo en diferentes condiciones físicas y químicas (Tabla 22).

Tabla 22. Desarrollo de *Brucella* en medio Tryptosa Agar *Brucella*- Dextrosa 1%- Suero equino inactivado 5%.

Cultivo de 4 días	CO ₂	Aire	Safranina-O	Fucsina	Tionina 1/50000	Tionina 1/100000	Producción H ₂ S
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	+	-	+	+D	-	-	+
<i>B. abortus</i> búfalo	+++	+++	+++	+++	+	+++	-

Las tres características diferenciales más importantes fueron el crecimiento en aerobiosis, el crecimiento en dos concentraciones de tionina y la producción de ácido sulfhídrico (Figura 21).

Figura 21. Producción de sulfhídrico a partir de los cultivos de las cepas de *B. abortus* RN1 bv1 y *Brucella* spp. aislada en de búfalo.



De izquierda a derecha, los primeros tres tubos corresponden a cultivos de *B. abortus* RN1 biovar 1 (producción de sulfhídrico) y los últimos tres tubos a cultivos de *Brucella* spp. de búfalo.

Esta primera caracterización indica que la cepa correspondería a *B. abortus* bv 5 o bv 6 o *B. melitensis*.

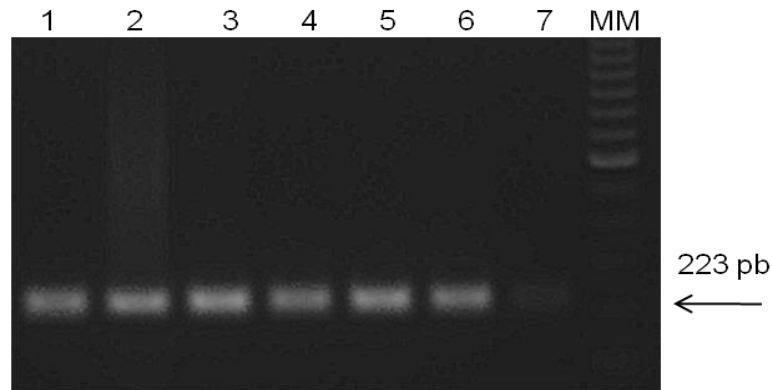
Cuando se analizó mediante los sueros monoespecíficos anti-*Brucella* la cepa obtenida aglutinó con suero anti-M, lo cual permitió diferenciarla de *B. abortus* bv1 y bv6, ya que ambas son A-dominantes. Sin embargo, éstos no permitieron diferenciarla de *B. melitensis*.

3.3.2. Tipificación molecular por PCR

3.3.2.1. Gen *omp31*

A partir del aislamiento de *Brucella* spp. de búfalos se logró amplificar, con los primers B4-B5, un fragmento de 223 pb, esperado para el género *Brucella*. Un idéntico fragmento fue amplificado a partir de las cepas de *B. abortus* RN1 bv1, *B. melitensis*, *B. abortus* cepa 19, *B. suis* y *B. canis* (figura 22).

Figura 22. Amplificación de un fragmento de 223 pb del gen *omp31* con primers B4-B5 en cepas de *Brucella* spp de referencia.



Calle 1, *B. abortus* silvestre; calle 2, *Brucella* spp búfalo; calle 3, *B. abortus* C19; calle 4, *B. suis*; calle 5, *B. melitensis*; calle 6, *B. canis*; calle 7, control negativo; MM, marcador molecular de 100 pb.

El alineamiento de las secuencias mostró 100% de identidad con *B. abortus* 2308, *B. abortus* RN1 bv1 y *B. abortus* cepa 19 (Figura 23), lo que confirmó que el aislamiento de búfalo pertenece al género *Brucella*.

Figura 23. Alineamiento de las secuencias amplificadas con los primers B4-B5

```

B.abortus 2308 bv1  TGGCTCGGTTGCGCATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCATTTGGG 80
B.abortus RN1  bv1  ..... 80
B.abortus C19  bv1  ..... 80
Brucella spp  Búf  ..... 80

B.abortus 2308 bv1  CCTATAACGGCACCGCCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTGCGCCTTCTGGCGACGCTTACC CGGAAACG 160
B.abortus RN1  bv1  ..... 160
B.abortus C19  bv1  ..... 160
Brucella spp  Búf  ..... 160

B.abortus 2308 bv1  ATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAAACATCAAATCGGTCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCG 224
B.abortus RN1  bv1  ..... 224
B.abortus C19  bv1  ..... 224
Brucella spp  Búf  ..... 224
    
```

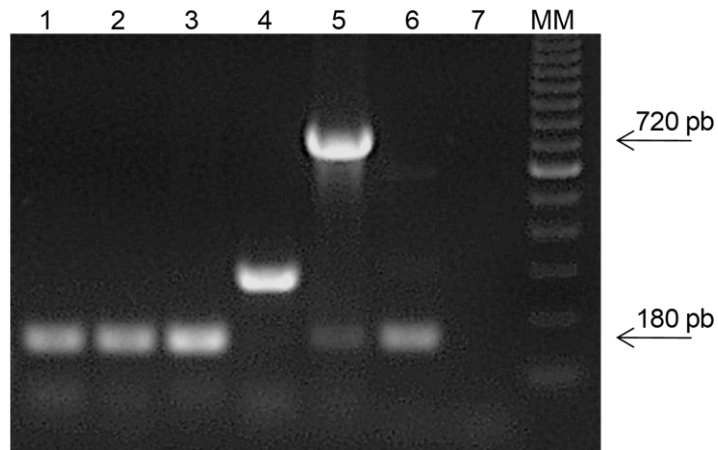
Se utilizaron las secuencias de *B. abortus* 2308 bv1 (Genbank AM040264.1), *B. abortus* RN1 bv 1 y *B. abortus* cepa 19 (GenBank CP000887.1).

3.3.2.2. Región comprendida entre el inserto *IS711* y el gen *alkB*

3.3.2.2.1. Primers específicos para *B. melitensis*

Los primers *B. melitensis*F- *IS711*R fueron utilizados con el objeto de dirimir si la cepa obtenida en búfalos corresponde a *B. abortus* o *B. melitensis*. Mediante este juego de primers se amplificó un fragmento específico de 721 pb solamente para *B. melitensis*. *Brucella* spp. aislada en búfalo, *B. abortus* RN1 bv1, *B. abortus* cepa 19 y *B. canis* mostraron una banda de ~ 180 pb, también amplificada débilmente por *B. melitensis*. Para *B. suis* se obtuvo una banda de aproximadamente 300 pb (Figura 23).

Figura 23. Amplificación de un fragmento de 721 pb específico para *B. melitensis* de la región comprendida entre el inserto *IS711* y el gen *alkB*.



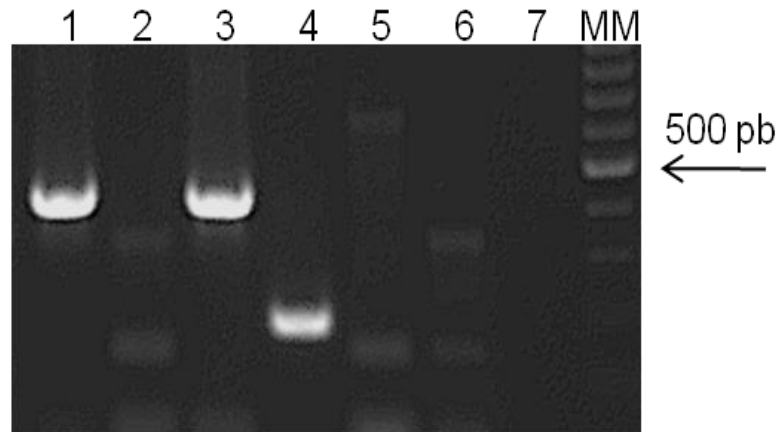
Calle 1, *B. abortus* silvestre; calle 2, *Brucella* spp. búfalo; calle 3, *B. abortus* C19; calle 4, *B. suis*; calle 5, *B. melitensis*; calle 6, *B. canis*; calle 7, control negativo; MM, marcador molecular.

Con estos primers, *Brucella* spp. de búfalo mostró un patrón genético diferente al de *B. melitensis* y similar a las de *B. abortus*, lo que permitió descartar que la cepa correspondiera a *B. melitensis*.

3.3.2.2.2. Primers específicos para *B. abortus* bv1, bv2 y bv4

Con los primers 416F-*IS711*R, se obtuvo un producto del tamaño esperado (498 pb) de *B. abortus* RN1 y cepa 19, ambas bv 1. No se logró amplificar producto alguno de la *Brucella* spp. aislada en búfalo a pesar de los reiterados intentos. *B. suis* mostró una banda de 200 pb (Figura 24).

Figura 24. Amplificación de un fragmento de 498 pb específico para *B. abortus* bv1, bv2 y bv4 de la región comprendida entre el inserto *IS711* y el gen *alkB*.



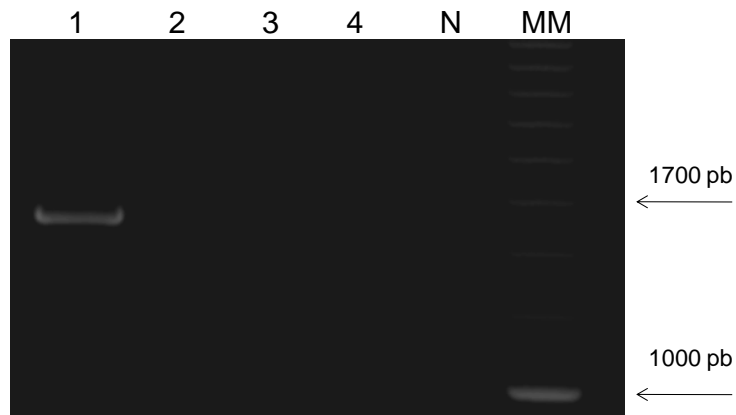
Calle 1: *B. abortus* RN1 bv1 (498 pb); calle 2: *Brucella* spp. búfalo; calle 3: *B. abortus* C19 (498 pb); calle 4: *B. suis*, (~200pb); calle 5: *B. melitensis*; calle 6: *B. canis*; calle 7: control negativo, MM: marcador molecular de 100 pb.

La utilización de ambos juegos de primers permitió definir que la cepa obtenida en búfalos es *B. abortus* y que no pertenece a los biovars 1, 2 ni 4.

3.3.2.2.3. Primers específicos para *B. abortus* bv3b, bv5, bv6 y bv9

Con los primers DEL569-*IS711*R, se obtuvo un producto del tamaño esperado (1.700 pb), lo que permitió confirmar, junto con la tipificación bacteriológica y serológica, que el asilamiento a partir del feto bubalino correspondió a *B. abortus* bv5 (Figura 25).

Figura 25. Amplificación de un fragmento de 1.700 pb específico para *B. abortus* bv3b, bv5, bv6 y bv9 de la región comprendida entre el inserto *IS711* y el gen *alkB*.



Calle 1: *Brucella* spp. búfalo; calle 2: *B. abortus* RN1 bv1; calle 3: *B. abortus* C19 (498 pb); calle 4: *B. melitensis*; N: control negativo, MM: marcador molecular de 1000 pb.

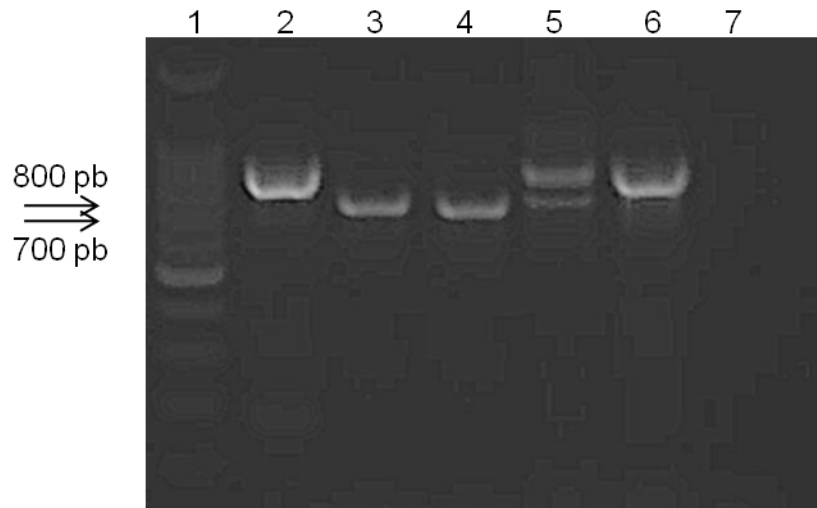
El sistema de secuenciación utilizado permitió analizar 850 pb del fragmento amplificado de 1700 pb. Las secuencias alinearon en un 98% con distintas especies de *Brucella* y se identificaron en las regiones flanqueantes del fragmento de 5,4 Kb presente en las secuencias de *Brucella* spp. depositadas en el GenBank (*B. melitensis*, *B. abortus* 2308, *B. abortus* cepa19 y *B. suis*). En la región 5' de ese fragmento se alinearon 350 pb y en la región 3', 500 pb.

3.3.2.3. Gen *omp2ab*

3.3.2.3.1. Primers DSF-DSR2

Un fragmento de aproximadamente 800 pb se obtuvo con los primers DSF-DSR2 a partir del aislamiento de búfalos. Se observó un perfil similar al de *B. melitensis* y diferente de *B. abortus* RN1 bv1, *B. abortus* cepa 19 y *B. suis* (Figura 26).

Figura 26. Amplificación de fragmentos del gen *omp2ab* mediante los primers DSF-DSR2 en cepas de referencia.



Calle 1, Marcador molecular de 100 pb (Promega®); calle 2, *Brucella* spp. búfalo; calle 3, *B. abortus* RN1 bv 1; calle 4, *B. abortus* C 19; calle 5, *B. suis*; calle 6, *B. melitensis*; calle 7, control negativo.

El análisis de la secuencia del fragmento amplificado para *Brucella* spp. de búfalo mostró un 100% de identidad con *B. abortus* bv 5 y *B. melitensis* y mostraron una inserción de 139 pb en relación a *B. abortus* RN1, *B. abortus* 2308 y *B. abortus* C19, todas ellas pertenecientes al bv 1 (Fig 27).

Figura 27. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas amplificadas con los primers DSF-DSR2 en muestras de ADN de diferentes cepas de *Brucella* spp.

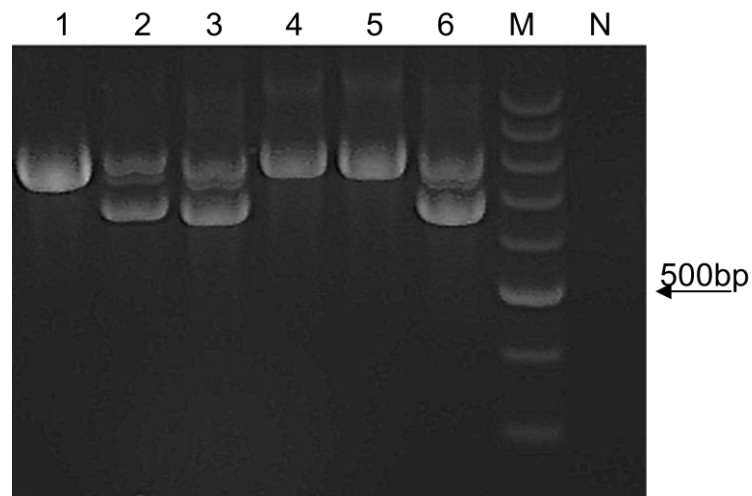
<i>B. melitensis</i>	CGCTCAGGCTGCCGACGCAATCGTCGCGCCAGAGCCCGAAGCCGTTGAATATGTCGCGTTTGCAGCGTTACGGCGGTG	80
<i>B. abortus</i> bv 5	80
<i>Brucella</i> buf	80
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	80
<i>B. abortus</i> C19	80
<i>B. abortus</i> 2308	80
<i>B. melitensis</i>	GCTACTTCTACATTCCGGGCACCGAAACCTGCCTGCGCGTCCATGGTTACGTCCGTTACGACGTAAGGGCGGGGATGAC	160
<i>Brucella</i> bv 5	160
<i>Brucella</i> buf	160
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	160
<i>B. abortus</i> C19	160
<i>B. abortus</i> 2308	160
<i>B. melitensis</i>	GTTTACTCCGGTACCGACCGCAATGGCTGGGACAAGGGCGCTCGTTTCGCACCTCATGTTCAACACGAAATTCGGAAACCGA	240
<i>Brucella</i> bv5	240
<i>Brucella</i> buf	240
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	240
<i>B. abortus</i> C19	240
<i>B. abortus</i> 2308	240
<i>B. melitensis</i>	ACTCGGCACACTCGGCACCTTACTCAGCTCGGCTTCAACTACACCAGCAACAATTCACGTCATGATGGCCAATACGGCG	320
<i>Brucella</i> bv5	320
<i>Brucella</i> buf	320
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	320
<i>B. abortus</i> C19	320
<i>B. abortus</i> 2308	320
<i>B. melitensis</i>	ATTTACGCGATGATCGTGATGTCGCTGATGGCGCGTAAGCACCAGCCGATCTGCAGTTTGCATATATACAGCTTGGT	400
<i>Brucella</i> bv5	400
<i>Brucella</i> buf	400
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	368
<i>B. abortus</i> C19	368
<i>B. abortus</i> 2308	368
<i>B. melitensis</i>	GGTTTCAAGGTGGTATCGACGAATCCGAATCCATACCTTACCAGGTTACCTCGGTGATGTCATCAACGATGATGTCGT	480
<i>Brucella</i> bv5	480
<i>Brucella</i> buf	480
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	368
<i>B. abortus</i> C19	368
<i>B. abortus</i> 2308	368
<i>B. melitensis</i>	CGCTGCTGGCTCCTACCGCACCGCAAGATCGCCTACACCTTACCCGGGAAACGGCTTCTCGGCTGTGATCGCTCTCG	560
<i>Brucella</i> bv5	560
<i>Brucella</i> buf	560
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	422
<i>B. abortus</i> C19	422
<i>B. abortus</i> 2308	422
<i>B. melitensis</i>	AACAGGTTGGCAAGACGTTGACAAAGATTACACGATCGACGGTTACATGCCGCACGTTGTTGGCGGCTGAAATATGCT	640
<i>Brucella</i> bv5	640
<i>Brucella</i> buf	640
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	502
<i>B. abortus</i> C19	502
<i>B. abortus</i> 2308	502
<i>B. melitensis</i>	GGCGGCTGGGGTTCGATCGCTGGTGTGTTGCTTATGACTCGGTTCATCGAAGAATGGGCTACAAAGGTTCTGGGCGAGT	720
<i>Brucella</i> bv5	720
<i>Brucella</i> buf	720
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	582
<i>B. abortus</i> C19	582
<i>B. abortus</i> 2308	582
<i>B. melitensis</i>	CAACATCACCGACCGGTTCTCGGTATGGTGCAGGGCGCATATTCTCCGACGACGCCGAACAGAACTACGGTCAGT	800
<i>Brucella</i> bv5	800
<i>Brucella</i> buf	800
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	662
<i>B. abortus</i> C19	662
<i>B. abortus</i> 2308	662
<i>B. melitensis</i>	GGGGCGGCGATTGGGCTGCTGGGGTGGTGCAAGTTTCATTGCCCGGAAAAGGCAA	857
<i>Brucella</i> bv5	857
<i>Brucella</i> buf	857
<i>B. abortus</i> RN1 bv1	719
<i>B. abortus</i> C19	719
<i>B. abortus</i> 2308	719

Se utilizaron las secuencias de *B. abortus* 2308 biovar 1 ([AM040264.1](#)), *B. melitensis* ([U26440.1](#)) y *B. abortus* bv 5 ([U26438.1](#)) obtenidas de Genbank y *B. abortus* de búfalo, *B. abortus* RN1 bv1 y *B. abortus* cepa 19 multiplicadas en laboratorio para este trabajo. Se observa una inserción de 139 pb (368 - 507) en *B. melitensis*, *B. abortus* bv 5 y *Brucella* de búfalo.

3.3.2.3.2. Primers DSF-DSR

La cepa de *Brucella* spp. aislada de búfalo mostró un único fragmento de aproximadamente 800 pb, similar al de *B. melitensis*. Las cepas de *B. abortus* biovar 1 (*B. abortus* 2308, *B. abortus* RN1 y *B. abortus* cepa 19) mostraron los dos fragmentos esperados de 689 pb y 804 pb (Figura 28).

Figura 28. Amplificación del gen *omp2ab* con primers DSF-DSR en distintas cepas de *Brucella*.



Calle 1, *Brucella* spp búfalo; calle 2, *B. abortus* RN1 (689-804); calle 3, *B. abortus* C 19 (689-804); calle 4, *B. suis*; calle 5, *B. melitensis*; calle 6, RB51; M, marcador molecular de 100pb (Promega); N, control negativo.

El análisis de la secuencia mostró 100% de similitud con *B. abortus* bv5 y *B. melitensis*, con un tamaño de 827 pb (Figura 29).

Figura 29. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas amplificadas con los primers DSF-DSR en muestras de ADN de diferentes cepas de *Brucella* spp.

```

B. melitensis      GCGCTCAGGCTGCCGACGCAATCGTCGCGCCAGAGCCCGAAGCCGTTGAATATGTCCGCGTTTGGACGCTTACGGCGCT  80
B. abortus bv5    ..... 80
Brucella búfalo   ..... 80

B. melitensis      GGCTACTTCTACATTCCGGGCACCGAAACCTGCCTGCGCGTCCATGGTTACGTCGGTTACGACGTAAAGGGCGGGCATGA  160
B. abortus bv5    ..... 160
Brucella búfalo   ..... 160

B. melitensis      CGTTTACTCCGGTACCGACCGCAATGGCTGGGACAAGGGCGCTCGTTTCGCACTCATGTTCAACACGAATTCGGAAACCG  240
B. abortus bv5    ..... 240
Brucella búfalo   ..... 240

B. melitensis      AACTCGGCACACTCGGCACCTATACTCAGCTGCGCTTCAACTACACCAGCAACAATTCACGTCATGATGGCCAATACGGC  320
B. abortus bv5    ..... 320
Brucella búfalo   ..... 320

B. melitensis      GATTTTCAGCGATGATCGTGATGTCGCTGATGGCGGCGTAAGCACCCGGCACCAGTCTGCAGTTTGCATATATCACGCTTGG  400
B. abortus bv5    ..... 400
Brucella búfalo   ..... 400

B. melitensis      TGGTTTCAAGGTTGGTATCGACGAATCCGAATCCATACCTTACCCTCGGTGATGTCATCAACGATGATGTCG  480
B. abortus bv5    ..... 480
Brucella búfalo   ..... 480

B. melitensis      TCGCTGCTGGCTCCTACCGCACCGGCAAGATCGCCTACACCTTACCCTCGGCGGAAACGGCTTCTCGGCTGTGATCGCTCTC  560
B. abortus bv5    ..... 560
Brucella búfalo   ..... 560

B. melitensis      GAACAGGGTGGCGAAGACGTTGACCAACGATTACACGATCGACGGTTACATGCCGCACGTTGTTGGCGGCTGAAATATGC  640
B. abortus bv5    ..... 640
Brucella búfalo   ..... 640

B. melitensis      TGGCGGCTGGGGTTCGATCGCTGGTGTGTGCTATGACTCGGTCATCGAAGAATGGGCTACAAAGGTTTCGTGGCGACG  720
B. abortus bv5    ..... 720
Brucella búfalo   ..... 720

B. melitensis      TCAACATCACCGACCGGTTCTCGGTATGGCTGCAGGGCGCATATTCGTCCGACGCGACCCGAAACAGAACTACGGTCAG  800
B. abortus bv5    ..... 800
Brucella búfalo   ..... 800

B. melitensis      TGGGGCGGCGATTGGGCTGTCTGGGGT  827
B. abortus bv5    ..... 827
Brucella búfalo   ..... 827

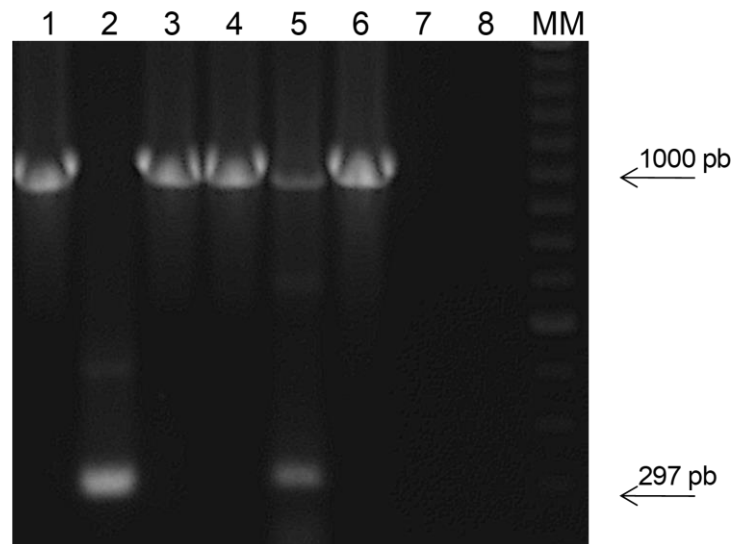
```

Se utilizaron las secuencias de *B. melitensis* (U26440.1) y *B. abortus* bv5 (U26438.1) obtenidas de GeneBank.

3.3.2.4. Gen *eri*

Mediante los primers Eri1-Oligo2 se amplificó un fragmento de 1000 pb en las diferentes especies de *Brucella* exceptuando *B. abortus* cepa 19 que mostró la delección esperada de 703 pb con un tamaño de banda de 297 pb (Figura 30).

Figura 30. Amplificación de un fragmento de 297 pb específica para *B. abortus* cepa 19.



Calle 1, *B. abortus* RN1 bv1; calle 2, *B. abortus* C 19; calle 3, *B. canis* ; calle 4, *B. melitensis* ; calle 5, *B. suis* ; calle 6, *Brucella* spp. búfalo; calle 7, control negativo; calle 8, sin ADN; MM, marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®).

Las secuencias amplificadas con estos primers mostraron que la de *B. abortus* aislada en búfalos fue 100% similar a la de otras especies de *Brucella* (Figura 31) y diferente a *B. abortus* cepa 19 (Figura 19).

Figura 31. Alineamiento de la secuencia de 1000 pb del gen *eri* amplificado en Búfalos y de cepas de referencia.

```

B.abortus 2308 bv1 GCGCCGCGAAGAACTTATCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCGGAGGTGGCCGAACATGCGGCAGGTGCGGGCCTCGACT 80
B.abortus RN1 bv1 ..... 80
Brucella spp búfalo ..... 80

B.abortus 2308 bv1 ATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCAAATTTGGCGAGACGATTGCCGAATGCATGAAGCTTCAGGATCGGCTC 160
B.abortus RN1 bv1 ..... 160
Brucella spp búfalo ..... 160

B.abortus 2308 bv1 ACCGCCGCTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGGCCGATATCGACCATGGTGACGTGACATCCGCTAACCCGGACGA 240
B.abortus RN1 bv1 ..... 240
Brucella spp búfalo ..... 240

B.abortus 2308 bv1 CTACGATCCTTACGCATGGGCCCGCACCGTGCCGAAAGTCTCGCCCATCATCCATATCAAGCAAAGCCTGATGGACAAGG 320
B.abortus RN1 bv1 ..... 320
Brucella spp búfalo ..... 320

B.abortus 2308 bv1 GCGGGCATCGTCCTTTACAGCCGCGTTCAATGCCAAGGGCCGCATCCAGCCGGAACCGCTTTTGAAGCCCTTTGCCGAA 400
B.abortus RN1 bv1 ..... 400
Brucella spp búfalo ..... 400

B.abortus 2308 bv1 GGCGGCGCGTGGATAATGAAATCTGCCTTGAACTTTCGTCAAGGAGCGGAGCCGAACGCCGTGAAGTCATTCACAA 480
B.abortus RN1 bv1 ..... 480
Brucella spp búfalo ..... 480

B.abortus 2308 bv1 GATTGCAGAAAGTGTGGCTTCTGGGCGCCGACATTTGACACCCGGCGCTAAGGACTTGAAGATATAGGAAATTTCCAGAA 560
B.abortus RN1 bv1 ..... 560
Brucella spp búfalo ..... 560

B.abortus 2308 bv1 CCGGACCGCGTTC AATGGCAGATGCAGACGATTTCTTGGCGCTTCGCGCCGCTGGCTTCATTTCTGTCGCGGCATGACT 640
B.abortus RN1 bv1 ..... 640
Brucella spp búfalo ..... 640

B.abortus 2308 bv1 CAGTCTGCCGTTGCCAAGCGCCTTGGCCTGCCTTCGGTGAAAGCGCATCGTCTCATCGCCAAGGCCGTTGCCACGGCGC 720
B.abortus RN1 bv1 ..... 720
Brucella spp búfalo ..... 720

B.abortus 2308 bv1 GGTGAAAGTGACCATCGACGGTGACATCACC GAATGCATCGATCTGGAAAACCGTCTGGCCGATCTTTACGGCCTCGATT 800
B.abortus RN1 bv1 ..... 800
Brucella spp búfalo ..... 800

B.abortus 2308 bv1 ATTGCGAGGTCGCACCCGATATTGGCGAGGAAGCCCTGCCGCTGATGGCGCTTGCCATGCGGGCGCAAATTTTCATGCCG 880
B.abortus RN1 bv1 ..... 880
Brucella spp búfalo ..... 880

B.abortus 2308 bv1 CGCGAAATCGAACATGGCGATCATGAGGTCATCGGCATCGGCATGGCCGACACTTTCGGCAGCGGTGGTTATATGCC 960
B.abortus RN1 bv1 ..... 960
Brucella spp búfalo ..... 960

B.abortus 2308 bv1 GCGTGCATGGCC AATGATCTGCGTTTCGTCTCGCTTCTGGG 1002
B.abortus RN1 bv1 ..... 1002
Brucella spp búfalo ..... 1002

```

Se utilizaron las secuencias de *B. abortus* 2308 (GenBank X78881.1), de la cepa de referencia RN1 y de la cepa de *Brucella* spp. aislada de búfalo.

En la tabla 23 se muestran los productos amplificados para cada especie y biovar de *Brucella*.

Tabla 23. Tipificación molecular para diferenciar *B. abortus* bv5 de *B. abortus* bv1 y *B. melitensis* bv1. Genes utilizados y tamaño de los fragmentos esperados.

Especie	Biovar	<i>omp31</i>	<i>alkB/IS711</i>	<i>omp2ab</i>*	<i>omp2ab</i>**	<i>eri</i>
<i>B. abortus</i> C19	bv1	223 pb	498 pb	719 pb	689 – 804 pb	297 pb
<i>B. abortus</i> 2308 y RN1	bv1	223 pb	498 pb	719 pb	689 – 804 pb	1000 pb
<i>B. abortus</i>	bv5	223 pb	1.700 pb	857 pb	827 pb	1000 pb
<i>B. melitensis</i>	bv1	223	721 pb	857 pb	827 pb	1000 pb

* Primers DSF/DSR2

** Primers DSF/DSR

El laboratorio de OIE identificó a la cepa obtenida en búfalo como *B. abortus* bv5.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En Argentina existen escasos antecedentes sobre brucelosis en búfalos. Para el diagnóstico y el control de la enfermedad se aplican las mismas herramientas y estrategias que se utilizan en bovinos, a pesar de tratarse de especies diferentes (OIE, 2000; SENASA, 2005). En el presente trabajo, se demostró que las pruebas serológicas usadas en bovinos para el diagnóstico de brucelosis también pueden ser utilizadas en búfalos, pero algunas de ellas requieren de modificaciones tanto de la técnica como en la interpretación de los resultados. La combinación de las pruebas serológicas y moleculares permitieron establecer situaciones epidemiológicas de brucelosis diferentes entre los rodeos bubalinos de Formosa y los de Corrientes. Hubo evidencias del uso de la vacuna de *B. abortus* cepa 19 en búfalos de ambas provincias, pero sólo en Formosa se identificó *B. abortus* silvestre. Notablemente además de *B. abortus* bv1 por primera vez en Argentina se identificó *B. abortus* bv5 tanto en búfalos como en bovinos de Formosa y se corroboró su presencia en la misma zona a través de la tipificación biológica y molecular de una cepa de *B. abortus* aislada previamente de un aborto bubalino, la que fue utilizada como cepa de referencia para comparar los hallazgos de campo.

Debido a la imposibilidad de contar con aislamientos en *Brucella* spp. de búfalos, para la validación de las pruebas serológicas se recurrió a la FC como prueba patrón ya que es considerada de referencia internacional para el diagnóstico de brucelosis en diferentes especies domésticas (OIE, 2000; Nicola y Elena, 2009). Los búfalos positivos a FC mostraron títulos de anticuerpos en todas las diluciones evaluadas reflejando infecciones tanto crónicas como agudas. Nicoletti (1992) evaluó FC en sueros bubalinos de un rodeo infectado y la comparó con los aislamientos de *B. abortus* logrados de sus respectivas muestras de leche. Si bien la sensibilidad de FC no fue cuestionada, la especificidad reportada fue del 20% con una importante cantidad de falsos positivos. Sin embargo la baja probabilidad de aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras de leche (Morgan *et al.*, 1960), lleva indefectiblemente a detectar como falsos positivos a aquellos animales infectados en los que no se logra un aislamiento, razón por la cual la *Es* de una prueba debe evaluarse en animales de una población libre de brucelosis o en su defecto de rodeos serológicamente negativos (Greiner y Gardner, 2000; OIE, 2008). En 5 de los 13 rodeos bubalinos incluidos en el estudio transversal, la FC resultó negativa en todos los animales analizados y los datos de la encuesta epidemiológica realizada en Formosa mostraron que en 8 de los 17 rodeos donde se habían detectado muestras positivas a BPA, FC también resultó negativa. El hallazgo de estos rodeos bubalinos negativos a FC en el presente trabajo muestra que la técnica posee una adecuada especificidad.

En concordancia con lo esperado para una prueba tamiz (OIE, 2000), BPA mostró una elevada *Se*, con un insignificante número de falsos negativos por lo que sería de utilidad en búfalos. Al igual que para otras especies los positivos deberían confirmarse mediante otras técnicas de mayor especificidad.

Las pruebas de SAT y 2ME, interpretadas ya sea individualmente o en forma paralela tal como se las utiliza en bovinos, no serían adecuadas para búfalos. Cuando ambas pruebas se interpretaron en forma paralela según lo recomienda el SENASA para bovinos y búfalos, la proporción de positivos respecto de FC fue de 34,8%. Debe considerarse que para esta evaluación se contó con un número limitado de sueros positivos, por lo cual no sería adecuado referir este valor como *Se*. Aunque la *Es* de SAT/2ME resultó elevada dado el gran número de muestras negativas analizadas, se requiere de una estandarización y validación para el diagnóstico de brucelosis en búfalos, para adecuar el punto de corte que resulte en un incremento de la *Se* sin afectar la *Es*. La mayoría de los búfalos con títulos ≥ 106 UIFC fueron detectados también como positivos por SAT/2ME, mientras que los que tenían valores de 41-83 UIFC resultaron falsos negativos, por lo que una menor dilución de los sueros en SAT/2ME podría mejorar la performance de estas pruebas. Estas diferencias podrían estar asociadas a la mayor resistencia a la infección por *Brucella* en búfalos, coligada a los genes *Nramp1* y *MBL*. La selección de los animales seronegativos en esta especie genera indirectamente el aumento de las frecuencias del alelo resistente en las poblaciones bubalinas (Borriello *et al.*, 2006; Capparelli *et al.*, 2007 y 2008). En contraste, en bovinos no se halló asociación entre *Nramp1* y resistencia, a pesar de que también poseen una copia de dicho gen (Kumar *et al.*, 2005). Esta resistencia de los bubalinos podría relacionarse también con un control más eficaz de la infección con cepas vacunales asociada a un menor nivel de aglutininas, resultando en una escasa cantidad de positivos y una menor *Se* de las pruebas aglutinantes como SAT y 2ME. No menos importante es el impacto que podría causar la presencia de *B. abortus* bv5 en relación con las técnicas de diagnóstico aglutinantes, ya que éstas se basan en la utilización de epítopes de *B. abortus* bv1 caracterizados por antígenos “A”, mientras que *B. abortus* bv5 está relacionada antigénicamente a *B. melitensis*, ambas con predominancia de antígenos “M” (OIE, 2008), por lo que habría que esperar una menor detección de anticuerpos aglutinantes. A pesar de la baja proporción de positivos exhibida por las pruebas aglutinantes, se observó una concordancia de 96,7% entre FC y SAT/2ME, aunque estos valores mostraron limitada consistencia a juzgar por los índices *kappa*. Esto se debería al escaso número de positivos analizados (n=23) enmascarado por la gran población de bubalinos negativos (n=493) y por la elevada especificidad relativa encontrada (99,6%). Las pruebas de SAT/2ME han mostrado en bovinos valores de *Se* y *Es* por debajo de los

estándares (McGiven *et al.*, 2003) y la OIE (2002a) recomienda su discontinuación por los numerosos falsos positivos resultantes. Como se mencionara anteriormente, para mejorar su rendimiento estas pruebas requieren de una validación con un mayor número de muestras de búfalos infectados por *B. abortus*, aunque sería recomendable su paulatino reemplazo por otras pruebas más eficientes.

El rendimiento de FPA medido por el valor ROC en las muestras que franquearon el análisis fue satisfactorio y mostró alta *Es* y concordancia con FC. Sin embargo, su eficiencia se vio afectada por los 23 sueros (2,67%) que FPA no pudo discriminar por lecturas fallidas. Una de las causas de las lecturas erróneas podría estar relacionada a la presencia de riboflavina en el suero, que como ha sido demostrado para muestras de leche genera fluorescencia inespecífica e interfiere con aquella emitida por la fluoresceína propia de FPA (Gall *et al.*, 2002). Si bien las concentraciones en leche son más altas, la riboflavina se encuentra en sangre y en todos los tejidos y hasta el momento no hay reportes sobre cuál es el límite de concentración de esta sustancia para que no interfiera con la técnica. Cabe señalar que este fenómeno se dio únicamente en los establecimientos de Formosa, lo que podría relacionarse con una distribución regional de compuestos cromógenos presentes en la alimentación de los bubalinos. Solares Juárez (2003) reporta que las cantidades variables de este compuesto en alimentos utilizados en la nutrición animal como el maíz, estarían determinadas en su mayor proporción por condiciones particulares del medio ambiente y de las prácticas de cultivo.

El punto de corte para FPA que surgió del análisis (≥ 87 UmP) fue inferior al recomendado para la especie bovina, donde el status de sospechoso se da a los individuos con títulos ≥ 94 y ≤ 104 UmP y de positivo a las reacciones ≥ 105 UmP (Nicola y Elena, 2009). La distribución de los títulos de UmP en FPA no mostró una buena polarización entre negativos/positivos y se observó un agrupamiento de los negativos inmediatamente antes del punto de corte, lo que podría afectar la definición del status de infección. En un trabajo realizado por Montagnaro *et al.* (2008) en Italia utilizando FPA en sueros bubalinos positivos y negativos y tomando como referencia a FC, se obtuvieron resultados satisfactorios con valores de ROC (0,957), *Se* (92,6%) y *Es* (91,2%) muy similares a los de este trabajo, no obstante el punto de corte establecido fue de 117 UmP. Este valor podría estar asociado a la menor dilución de los sueros utilizada (1/10) por estos autores, en relación con la dilución 1/100 usada en este trabajo. Hasta tanto no se resuelva el problema local de las lecturas fallidas, FPA sería de menor practicidad que las otras pruebas evaluadas ya que se debería recurrir a otra muestra o a otra técnica de diagnóstico para definir el resultado.

ELISA-c alcanzó el mayor valor de *Es* entre todas las técnicas de nueva generación, su valor ROC fue también elevado y mostró la mayor polarización de los resultados entre los sueros

positivos y negativos, lo que la muestra como una técnica altamente específica por lo que sería de gran utilidad como confirmatoria. El acuerdo con FC superó el 90% en el rango de 41- 106 UIFC y fue del 100% a partir de las 331 UIFC. El punto de corte para ELISA-c en bubalinos fue $\geq 28\%$ I, también inferior al usado en bovinos, que es $\geq 40\%$ I (Nicola y Elena, 2009).

ELISA-i M23 mostró un pobre desempeño para la especie bubalina, con un valor ROC insuficiente (0,733), debiendo considerarse que a medida que el área bajo la curva se acerque al valor de 0,50, las probabilidades de que una muestra exhiba un valor positivo o negativo dependen del azar (Fosgate *et al.*, 2003a), lo cual se hizo evidente en la casi nula polarización entre los valores positivos y negativos. Su concordancia con FC fue baja como también la correlación (R^2) con otras técnicas de mejores rendimientos. La reducida eficacia de ELISA-i M23 podría atribuirse a una dificultad en la unión del anticuerpo monoclonal (M23) específico para un epítipo de la IgG bovina, con la IgG de bubalinos ya que se trata de especies diferentes. Por lo expuesto, ELISA-i M23 no sería una técnica apropiada para su uso en bubalinos. Es factible que la utilización de un anticuerpo policlonal anti-IgG de bovinos salvaría dicha situación ya que reconocen múltiples epítipos, algunos de ellos comunes entre las IgG de diferentes especies relacionadas. A diferencia del búfalo el M23 reconoce un epítipo en las Ig de los pequeños rumiantes (Nielsen *et al.*, 1992). En contraste ELISA-i A/G mostró un muy buen desempeño, probablemente debido la alta afinidad de la proteína quimérica A/G para unirse inespecíficamente a las Ig de búfalos, como ha sido descrito para otros mamíferos domésticos y silvestres (Nielsen *et al.*, 2004). Esta técnica evidenció una muy buena distribución de positivos y negativos, los %P de ELISA-i A/G mostraron una buena distribución y los negativos se agruparon mayormente en los valores $< 15\%$ P mientras que el punto de corte fue $\geq 30\%$ P. Esta prueba mostró el mejor valor ROC (0,977), la mayor *Se* de todas las técnicas evaluadas - característica deseable para una prueba tamiz - y una adecuada *Es*. El acuerdo entre ELISA-i A/G y FC fue de 82,8% en el rango de 41-83 UIFC y de 100% a partir de las 106 UIFC, resultando en una nueva alternativa para el diagnóstico de brucelosis en búfalos.

La mejor polarización en la distribución observada en ELISA-c y ELISA-i A/G hace que los resultados sean más confiables y presenten ventajas sobre FPA.

Cuando se compararon los resultados obtenidos por las diferentes pruebas de nueva generación el mejor rendimiento fue para ELISA-i A/G, con un valor ROC cercano a 1 (0,977), seguida por FPA (0,947) y ELISA-c (0,936). Si bien se afirma que el valor ROC debería utilizarse para establecer la eficacia de una prueba porque ofrece un parámetro global de rendimiento (Zweig y Campbell, 1993) debe tenerse en cuenta el decremento en la eficacia de la prueba FPA debido a los sueros que resultaron con lectura fallida y diagnóstico inconcluso.

Las tres técnicas diagnósticas con mejores rendimientos – ELISA-i A/G, FPA y ELISA-c – también mostraron una aceptable correlación ($R^2 > 0.64$) cuando fueron comparadas entre sí.

Hubo evidencias de una amplia distribución de *B. abortus* cepa 19 en rodeos bubalinos de Formosa y de Corrientes y al igual que en bovinos, la persistencia de anticuerpos generados por la vacuna produjo interferencias para establecer el estatus de infección por *B. abortus* silvestre, el cual en varios casos pudo ser dilucidado a través de los estudios moleculares.

Las concordancias elevadas entre FPA/ELISA-i A/G y ELISA-c con FC cuando los niveles de anticuerpos fueron superiores a 165 UIFC indicaría que éstos serían específicos para *Brucella* spp. silvestre; mientras que las discrepancias observadas cuando los títulos de Ig fueron ≤ 165 UIFC responderían a anticuerpos vacunales, los que podrían ser mejor discriminados por ELISA-c y FPA, de la misma manera que se describe para bovinos. Aguirre *et al.* (2002) encontraron que después de la vacunación con *B. abortus* cepa 19 la mayor proporción de terneras vacunadas se tornó negativa por ELISA-c y por FPA antes que por FC. En otro trabajo realizado en bubalinos, donde se vacunaron hembras distribuidas en grupos de edades comprendidas entre los 3 y los 8 meses de vida, se encontró que el 58,3% de los animales vacunados fue positivo por FPA y los anticuerpos declinaron en todos los casos a los 120 días post-vacunación (Varlamoff, N. *et al.*, dato no publicado). Estos resultados coinciden con los expuestos por Russo *et al.* (2010) en un reporte epidemiológico en bovinos de la provincia de Formosa, donde las mayores concordancias de FPA y ELISA-c con FC se encontraron a partir de las 165 UIFC. A través de la epidemiología molecular en tres rodeos bubalinos se evidenció *B. abortus* cepa 19, asociado a niveles de anticuerpos menores a 165 UIFC, lo que confirmaría la detección de anticuerpos post-vacunales.

Los búfalos están incluidos desde el año 2006 en el programa oficial de control y erradicación que establece la vacunación con *B. abortus* cepa 19 que se aplica, al igual que en bovinos, a todas las hembras de entre 3 y 8 meses de edad. A causa de las adversidades del clima, de la topografía de la región y de las características de la especie, las prácticas de manejo de la cría de búfalos en el país se desarrollan mayormente en condiciones extensivas y con mínimos controles sanitarios. Por estas razones no es infrecuente que los animales se revacunen por error o que se vacunen animales mayores de 8 meses de edad, superando la edad máxima recomendada para evitar la interferencia de los anticuerpos post-vacunales con el diagnóstico serológico de brucelosis. Sería factible detectar en esos casos una mayor proporción de adultos positivos por serología, como fue demostrado en bovinos por Worthington *et al.* (1973) mediante FC y en bubalinos por Munir (2009) mediante ELISA-i con anticuerpos policlonales en trabajos de seguimiento de animales vacunados con C19 a la edad adulta. En ambos casos, los anticuerpos derivados de la vacunación se

mantuvieron detectables hasta transcurridos 180 días. La persistencia de anticuerpos después de la revacunación con *B. abortus* C19 no ha sido evaluada por las pruebas de nueva generación, sin embargo ha sido observado en casos aislados y generalmente por error de revacunación de terneras, que los anticuerpos post vacunales son detectables por ELISA-c y FPA por al menos 6 meses (Torioni de Echaide, dato no publicado).

No hubo relación entre las regiones fitogeográficas donde estaban ubicados los rodeos y la epidemiología de brucelosis, aunque sí se encontraron situaciones disímiles entre las provincias de Corrientes y Formosa. En los rodeos bubalinos de Corrientes donde no se observaron niveles de anticuerpos importantes y no se aisló ni se identificó por PCR *B. abortus* silvestre a partir de muestras obtenidas *in vivo* y *post mortem* de hembras positivas y en algunos casos preñadas, se podría concluir que los anticuerpos respondían a *B. abortus* C19, ya que esta cepa sí pudo ser identificada por PCR.

Una situación contrastante se observó en los bovinos (11 establecimientos) y bubalinos (2 establecimientos) de Formosa donde se detectaron rodeos con alta prevalencia a brucelosis y elevados títulos de anticuerpos por FC con identificación simultánea de *B. abortus* silvestre y *B. abortus* cepa 19 por PCR. Fue en esta región donde se identificó *B. abortus* bv1 y, por primera vez en bovinos y bubalinos de Argentina, también *B. abortus* bv5, mediante análisis de las secuencias de ADN amplificadas a partir del gen *omp2ab* y del gen *IS711/alkB* y verificada por la PCR combinatoria involucrando varios genes y primers. En estos casos, los niveles de anticuerpos respondían a la infección con cepas silvestres.

La encuesta epidemiológica reveló una mayor proporción de búfalos positivos a brucelosis en Formosa que en Corrientes, mientras que para bovinos no hubo diferencias entre ambas provincias. Esto podría deberse a que los bovinos fueron incorporados a los programas de control y erradicación de brucelosis mucho tiempo antes que los búfalos. Debe también considerarse que los diagnósticos realizados en bubalinos difirieron, ya que en Formosa se recurrió a FC y en Corrientes a BPA y SAT /2ME, pruebas que como hemos observado en este trabajo presentaron limitaciones. Debe considerarse además que la situación epidemiológica podría estar subestimada dado que los datos obtenidos de las encuestas provienen de muestreos sesgados realizados con propósitos distintos a la estimación de prevalencia, como lo es la comercialización de reproductores.

En relación con la situación epidemiológica de la región, habría que considerar que la provincia de Corrientes limita con Brasil donde la prevalencia de brucelosis en bovinos debida a *B. abortus* se estima en 4 a 5% para el período comprendido entre 1989 y 1998 (Brazil, 2001a). Desde 2001 está vigente un Plan Nacional de Control de la enfermedad que incluye a bovinos y bubalinos,

con pautas muy similares a las establecidas en Argentina como la vacunación con C19 de las hembras de 3 a 8 meses, diagnóstico serológico y envío a frigorífico de positivos (Brazil, 2001b) con lo que la situación actual, después de 11 años de control, debería haber mejorado ostensiblemente. Por su parte, la provincia de Formosa limita con Paraguay, donde la prevalencia en bovinos es de 3,15% (SENACSA, 2000) y también está vigente un programa de control en la especie bovina que establece la vacunación con C19 de las hembras de 3 a 8 meses y permite la revacunación con RB51. Sin embargo, se ha reportado que sólo el 40% de las hembras son vacunadas en este país (Baumgarten, 2002), lo cual puede representar un mayor riesgo de transmisión de cepas silvestres entre poblaciones susceptibles.

La distribución de rodeos positivos a brucelosis se concentró en Corrientes en los departamentos de Esquina (bubalinos) y Goya (bovinos). Sin embargo, como se mencionara anteriormente, la única cepa identificada por PCR fue *B. abortus* C19 tanto en muestras de sangre como de leche de bubalinos seropositivos y seronegativos. Esto indica la persistencia de ADN de la cepa vacunal aunque no demuestra la viabilidad de la misma. Draghi *et al.* (2010) encontraron en bovinos evidencias de ADN de la C19 hasta 360 días después de aplicada la vacuna, aún cuando la extinción de los anticuerpos había ocurrido. No se debería descartar tampoco una infección con C19 asociada a inmunizaciones tardías como está descripto para bovinos vacunados como adultos (Alton *et al.*, 1983). Es probable que por tratarse de establecimientos que utilizan las islas del Paraná dentro de los sistemas de explotación, la vacunación no se realice a la edad recomendada debido a las dificultades de manejo.

En este trabajo se muestra claramente la interferencia de *B. abortus* C19 con el diagnóstico de la enfermedad, lo que podría llevar a incurrir en un error con la venta a frigorífico de búfalos y bovinos no infectados. Por todo ello es importante realizar la vacunación temprana de las terneras bubalinas y bovinas. La vacunación con la cepa RB51 de *B. abortus* sería una alternativa para aplicar fuera de la edad reglamentaria para el uso de la C19, aunque deberían evaluarse alternativas de dosificación, dado que hay reportes de que a la dosis recomendada para bovinos RB51 no confiere adecuada protección en búfalos (Fosgate *et al.*, 2003b), pero sí lo logró cuando aquella se triplicó (Caporale *et al.*, 2010).

La mayor prevalencia de brucelosis encontrada en los departamentos de Pilcomayo, Patiño y Pirané en la provincia de Formosa está asociada al área centro - este donde se encuentra la mayor concentración de ganado bovino y bubalino, con mayores posibilidades de transmisión de la enfermedad. En el oeste de esta provincia la explotación principal es la de caprinos. La mayor prevalencia de brucelosis en aquellos rodeos con más cantidad de animales fue coherente con los

reportes que indican que el aumento en el tamaño de un rebaño determina un incremento en la probabilidad de infección (Christie, 1969) y en la dificultad para eliminar la enfermedad (Nicoletti, 1976), debido al mayor potencial de exposición determinado por la densidad de animales y por la introducción de individuos de reemplazo a partir de fuentes externas, ampliando las posibilidades de contagio (Nicoletti, 1980).

En el estudio transversal realizado en Corrientes en 11 rodeos bubalinos se observó una correspondencia entre las prevalencias halladas y los resultados de la encuesta epidemiológica. Cabe destacar que en Formosa se evaluaron en esta instancia solamente dos establecimientos.

Debido a que no se logró aislar *Brucella* spp. de las diferentes muestras (leche, sangre y otros tejidos) extraídas de hembras positivas a brucelosis durante la necropsia o *in vivo*, la tipificación se basó en el diagnóstico molecular (OIE, 2008) a partir de muestras de sangre de búfalos y bovinos relacionadas a los diferentes estudios epidemiológicos.

En la brucelosis crónica *Brucella* spp. se encuentra en macrófagos y neutrófilos (Martirosyan *et al.*, 2011), por lo que es posible detectarla en muestras de sangre y leche, aunque en este trabajo sólo a partir de algunos de estos especímenes obtenidos de hembras positivas se logró amplificar ADN de *Brucella*. Probablemente se debió a que la sangre y la leche no representan el tejido de elección para encontrar una elevada concentración de esta bacteria, excepto en casos agudos, cuando hay bacteriemia y eliminación continua o intermitente de *Brucella* por leche. La sensibilidad de la PCR alcanza su máxima expresión cuando se analizan los productos de un aborto, como fue reportado por Fiorentino *et al.* (2005) en un trabajo realizado sobre cultivos y diagnóstico molecular a partir de fluidos y órganos fetales en vacas infectadas experimentalmente con *B. abortus*.

A excepción de *B. abortus* cepa 19, que fue fácilmente identificada con un solo juego de primers a través de la amplificación del gen *eri*, las especies de *Brucella* silvestres necesitaron de la combinación de distintas PCR involucrando más de un gen para poder ser tipificadas.

El gen *omp2ab* fue de gran utilidad para identificar especies y biovares de *Brucella*. Dos fragmentos de 689 pb y 804 pb amplificados con los primers DSF-DSR y secuenciados, identificaron *B. abortus* bv1 (*B. abortus* RN1, RB51 y C19), mientras que un único fragmento de 827 pb fue encontrado para *B. abortus* bv5 y *B. melitensis* bv1 con 100% de similitud entre ambas secuencias. Mediante los primers DSF-DSR2 se logró identificar en el mismo gen una inserción de 139 pb encontrada también en *B. abortus* bv5 y *B. melitensis* bv1. La similitud entre cepas y la delección encontrada en dicho gen fueron descritos en un trabajo de Ficht *et al.* (1996), quienes

realizaron análisis de secuencias utilizando cultivos puros de cepas de *B. abortus* (bv1 y bv5), *B. canis*, *B. melitensis* (bv1), *B. neotomae*, *B. suis* (bv1) y *B. ovis*.

El gen *alkB* fue de utilidad para amplificar fragmentos específicos de 1.700 pb para *B. abortus* bv5, 498 pb para *B. abortus* bv1 y 721 pb para *B. melitensis* bv1. Los primers específicos para *B. melitensis* generaron fragmentos de ~180 pb tanto para *B. abortus* bv1 como para bv5.

Biancifiori (1998), usando los primers 416/*IS711* logró amplificar no sólo *B. abortus* bv1, sino también bv2 y bv4, y observó que *B. abortus* bv3, bv5, bv6, bv7 y bv9 no generaban producto debido al polimorfismo genético. Posteriormente Ocampo-Sosa *et al.* (2005), utilizando los primers DEL564/*IS711* que amplificaban una región diferente del gen *alkB*, observaron que estos biovares presentaban una delección de 5.400 pb, por lo que podían diferenciarse mediante la amplificación del mencionado fragmento de 1700 pb, mientras que bv1, bv2 y bv4 de *B. abortus* deberían generar un producto de 7.200 pb que, debido a su gran tamaño, no sería visualizado por electroforesis en gel en condiciones normales.

El polimorfismo genético del gen *eri* entre *B. abortus* C19 y las cepas silvestres, fue utilizado para identificar bovinos y búfalos vacunados, infectados o ambos, mediante la PCR convencional. En contraste cuando se realizó RT-PCR con el mismo par de primers las temperaturas de disociación o “melting” (T_m) de las cadenas de ADN no fueron lo suficientemente diferentes como para poder discriminar los animales vacunados y/o infectados, lo que limitaría la utilidad de RT-PCR al menos a partir de muestras clínicas. La técnica podría ser de mayor utilidad a partir de cepas puras obtenidas de cultivo (Winchell *et al.*, 2010).

La PCR dirigida al gen *omp31* no mostró buena sensibilidad en búfalos y tampoco se logró en éstos suficiente producto para enviar a secuenciar, a diferencia de lo que ocurrió en bovinos. La menor concentración de amplicones fue evidente también por RT-PCR medida a través de la emisión de fluorescencia. Las dificultades encontradas para la amplificación del ADN junto con los bajos niveles de anticuerpos detectados en búfalos por las pruebas aglutinantes podrían deberse a una menor concentración de bacterias relacionada a la ya explicada resistencia genética de algunos individuos frente a la infección por *Brucella* spp y no al polimorfismo ya que el gen es conservado en el género.

El biotipo 5 de *B. abortus* fue descrito por primera vez en Inglaterra en el año 1962 por Stableforth y Jones y en 1973 Meyer y Morgan establecieron la cepa de referencia. La secuencia del gen *omp2* fue reportada en el Genbank por Ficht *et al.* (1996). Todos los biovares de *B. abortus* excepto el bv5 fueron reportados en animales domésticos de Sudamérica (García-Carrillo, 1990), mientras que en la especie bubalina, Borghese y Mazzi (2005) citan que los biovares hallados

fueron el bv1, bv3, bv6 y bv7. En el trabajo realizado por Megid *et al.* (2005) sobre tipificación de cultivos provenientes de fetos bovinos y bubalinos abortados en Brasil, se reportó la presencia de bv1, bv2 y bv3 en bovinos y bv1 en bubalinos del Estado de Sao Paulo. En Argentina fueron reportados aislamientos de los bv1 y bv2 en bovinos y bv1 en bubalinos (Sanmartino, 2002).

Existen reportes de aislamiento e identificación de *B. melitensis* en bubalinos de India, Irán y otros países del Medio Oriente (Sen y Sharma, 1975, citados en Renukaradhya *et al.*, 2002; Dehkordi, 2012). Las similitudes tanto fenotípicas como genotípicas entre ambas cepas, podrían haber dado lugar a que en algunas ocasiones se hayan reportado como infecciones de *B. melitensis* bv1 a aquellas causadas por *B. abortus* bv5 en los casos en que la tipificación bioquímica y/o molecular no hayan sido lo suficientemente exhaustivas.

Luego de una profunda búsqueda, no se encontraron reportes que indiquen la presencia de *B. abortus* bv5 en búfalos ni en otras especies del continente americano. Está descripto que la manera más eficiente de introducción de cepas de *Brucella* a un rodeo estaría más relacionada con la incorporación de animales al grupo como reingresos luego de la recría o compra de reproductores, que con la transmisión entre rodeos adyacentes (Crawford *et al.*, 1979).

Se necesita profundizar los estudios epidemiológicos para conocer el origen, la distribución y la importancia de *B. abortus* bv5 en diferentes mamíferos domésticos y silvestres de la región y determinar los factores de riesgo involucrados en la transmisión. Es importante además realizar estudios que determinen el nivel de protección que podría conferir la vacuna realizada con *B. abortus* C19 (bv1) frente al desafío con bv5. No menos importante es determinar el impacto de *B. abortus* bv5 en la salud pública.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

5.1. Técnicas serológicas

Para el diagnóstico de brucelosis en búfalos BPA podría ser utilizada como prueba tamiz tal como se la utiliza en bovinos, mientras que SAT y 2ME requieren de modificaciones. ELISA-c, ELISA-i A/G y FPA resultaron métodos eficaces aunque FPA presenta algunas desventajas prácticas que podrían ser subsanadas. ELISA-i M23 no es adecuada para diagnosticar brucelosis en búfalos.

5.2. Diagnóstico molecular

La tipificación molecular es una herramienta muy útil para identificar cepas y biovares de *Brucella*, como alternativa o complementaria a la caracterización bioquímica clásica.

PCR convencional fue de mayor utilidad que RT-PCR, ya que permite diferenciar los productos por tamaño molecular. La Tm no permite diferenciar cepas de *Brucella* spp. en muestras clínicas. Los genes *omp2ab* y *alkB* junto al *IS711* (inserto estable) presentan un polimorfismo apto para diferenciar especies y biovares de *Brucella*.

B. abortus bv5 tiene amplias similitudes en varios genes con el bv1 de *B. melitensis*.

5.3. Epidemiología

B. abortus cepa 19 se encuentra diseminada en rodeos de bovinos y búfalos. La vacunación de animales mayores de los 8 meses de edad y las deficiencias de las técnicas diagnósticas para discriminar anticuerpos de infección o vacunación llevan a sobreestimar la prevalencia de brucelosis y a la venta innecesaria de animales sanos.

La presencia de los bv1 y bv5 de *B. abortus* y su distribución geográfica evidencian la transmisión de cepas de *Brucella* entre bovinos y búfalos que comparten el mismo nicho ecológico. Esto confirma la hipótesis planteada en el presente trabajo.

Se diferencian dos situaciones epidemiológicas para las provincias estudiadas, con una presencia marcada de *B. abortus* C19 para Corrientes y de *B. abortus* C19, y *B. abortus* silvestre bv1 y bv5 en Formosa.

CAPITULO VI. PROPUESTAS

Utilizar el diagnóstico molecular como referencia para la validación de nuevas técnicas diagnósticas serológicas, dadas las dificultades para lograr aislamientos y los riesgos que surgen de la manipulación de bacterias vivas.

Utilizar el diagnóstico molecular como una herramienta complementaria para la tipificación biológica de cepas y biovares de *Brucella*.

Adaptar los puntos de corte de las pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis en búfalos.

Llevar a cabo una investigación epidemiológica para evaluar la distribución de *B. abortus* bv5 en Argentina, en diferentes especies domésticas y silvestres.

Formar una base de datos con reportes de abortos en distintas especies con el objeto de lograr el aislamiento y tipificación de *Brucella* spp. y disponer de un cepario.

Evaluar la protección vacunal que confiere C19 frente a desafíos con *B. abortus* bv5.

Realizar estudios de patogenicidad de *B. abortus* bv5.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

1. ABDEL-RAHMAN, S.M. 2006. Evidences reveal that cattle and buffalo evolutionary derived from the same antecessor based on cytogenic and molecular markers. *Biotechnology in Animal Husbandry* 22 (3-4): 1-10.
2. ACHA, P.; SZYFRES, B. 1977. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales, 2nd ed., vol 1. OPS. Publicación científica No 354. 708 pp.
3. AGUIRRE NP., VANZINI VR., TORIONI DE ECHAIDE S., VALENTINI BS., DE LUCCA, G., AUFRANC, C.; CANAL, A.; VIGLIOCCO, A. NIELSEN, K. 2002. Antibody dynamics in Hostein Friesan heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 using seven serological tests. *J. Immunoassay*. 23 (4): 471-478.
4. AKHTAR, S.; MIRZA, M.A. 1995. Rates of seroconversion in the patohogeny of *Brucella abortus* seropositive and seronegative cattle and buffalo. *Revue Scientifique et Technique* 19: 867-870.
5. ALAM, M.; RAHMAN, M.; ISLAM, M.; SHAMSUDDIN, M. 1996. Serological survey of brucellosis in the Bangladeshi buffalo (*Bubalus bubalis*). Proceedings of the second Asian Buffalo Association Congress, PSAS Foundation: 193-197.
6. ALTON, G.G.; ELBERG, S.S. 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. *Vet. Bull.* 37, 793-800.
7. ALTON; G. G.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. 1983. Vaccination of cattle against brucellosis using either a reduced dose of strain 19 or one or two doses of 45/20 vaccine. *Australian Veterinary Journal*, 60 (6): 175-177.
8. ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. 190 pp.
9. ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, C.E.; CHRISTIE, P.J. 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 775-808.
10. AMERAULT, T.E.; MANTHEI, C.A.; GOOD, E.R. 1961. A heat inactivation test for differentiation specific and non-specific agglutination reaction of bovine brucellosis. *Amer. J. Vet. Res.* 22: 564-569.
11. ANDERSON, R. JENNES, R.; BRUMFIELD, H.; GOUGH, P. 1964. *Brucella* agglutinating antibodies. Relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. *Science* 143: 1334-1335.
12. ANDERSON, T.D.; MEADOR, V.P.; CHEVILLE, N.F. 1986a. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet Pathol* 23: 219-226.
13. ANDERSON, T.D.; CHEVILLE, N.F.; MEADOR, V.P. 1986b. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Vet Pathol* 23: 227-239.
14. ANGUS R.D.; BARTON C.E. 1984. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, 56: 349-356.
15. ARAYA, L.N.; WINTER, A.J. 1990. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect. Immun.* 58: 254-256.
16. BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* (95): 271-275.
17. BALDWIN, C.L.; JIANG, X.; FERNANDES, D. 1993. Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron. *Trends Microbiol.* 1: 99-104.
18. BARQUERO-CALVO, E.; CHAVES-OLARTE, E.; WEISS, D.; GUZMÁN-VERRI, C.; CHACÓN-DÍAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYÓN, I.; MORENO, E. 2007. *Brucella abortus* uses

a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of the infection. PLoS ONE 2(7): e631. doi:10.1371/journal.pone.0000631.

19. BAUMGARTEN, D. 2002. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary microbiology* (90): 63-69.

20. BENÍTEZ, D. F.; ZIMMER, P.A.; DRAGHI DE BENITEZ, M.G.; BIOTTI, G.M. 2006. Determinación de anticuerpos a *Brucella abortus* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) de la Provincia de Corrientes. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, supl. 3: 194.

21. BIANCIFIORI, F. 1998. Use of non-conventional tests for the diagnosis of brucellosis. En: *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. IAEA, Viena: 95-103.

22. BLASCO, J.M. 1990. *Brucella ovis*. En: NIELSEN, K. DUNCAN, J.R. *Animal Brucellosis*, CRC Press, Boca Ratón FL: 351-378.

23. BOGDANOVICH, T.; SKURNIK, M.; LUBECK, P.S.; AHRENS, P.; HOORFAR, J. 2004. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J Clin Microbiol* 42: 2261-2263.

24. BORGHESE, A.; MAZZI, M. 2005. Buffalo population and strategies in the world. In: BORGHESE, A. (Ed.) *Buffalo production and Research*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 1-40.

25. BORRIELLO, G.; CAPPARELLI, R.; BIANCO, M.; FENIZIA, D.; ALFANO, F.; CAPUANO, F.; ERCOLINI, D.; PARISI, A.; ROPERTO, S.; IANELLI, D. 2006. Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity* (74) 4: 2115-2120.

26. BOWDEN, R.A.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; BERNARD, S.; DUBRAY, G. 1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.* 63: 3945-3952.

27. BOWDEN, R.A.; BALDI, P.C.; CASSATARO, J. COMERCI, D.J.; ESTEIN, S. FOSSATI, C.A.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; GOLDBAUM, F.A; WALLACH, J.C. 2007. *Brucella*. En: Stanchi, N.O. (Ed.) *Microbiología Veterinaria*. Ed. Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina, pp 281-293.

28. BRAZIL, DEPARTAMENTO DE DEFESA ANIMAL. 2001a. Informações sobre o PNCBET. Brasília, Brazil: Ministério da Agricultura e Abastecimento, Jan 2001 [cited 18 February 2001]. Available from World Wide Web: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>.

29. BRAZIL, SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, 2001b. Instrução normativa n. 2, 10 Jan 2001b. *Diário Oficial*, 4 Jun 2001. Seção 1, 26-31.

30. BRICKER, B. J.; TABATABAI, L. B.; JUDGE, B. A. DEYOE, B. L.; MAYFIELD, J. E. 1990. Cloning, expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infection and immunity* 58 (9): 2935-2939.

31. BRICKER, B.; HALLING, S. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of clinical microbiology*: 2660-2666.

32. BRICKER, B.; HALLING, S. 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of clinical microbiology*: 1640-1642.

33. BRICKER B.J.; EWALT, D.R.; MACMILLAN, A.P.; FOSTER, G.; BREW, S. 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol.* 38: 1258-1262.

34. BRICKER, B.J. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* 90: 435-446.

35. BRICKER B.J.; EWALT, D.R.; OLSEN, S.C.; JENSEN, A.E. 2003. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest.* 15:374-378.
36. BUNDLE, D.; CHERWONOGRODSKY, J.; CAROFF, M.; PERRY, M. 1987. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 92-101.
37. CABRERA, A. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. En: Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. 2º Ed. Tomo II, (1): 3-34.
38. CANNING, P.C.; ROTH, J.A.; DEYOE, B.L. 1986. Release of 5'- guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 154: 464-470.
39. CANNING P.C., DEYOE B.L., ROTH J.A. 1988. Opsonin dependent stimulation of bovine neutrophil oxidative metabolism by *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 49: 160- 162.
40. CARLSSON, H.; HURVEL, B.; LINDBERG, A. 1976. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for titration of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 84C: 168 - 176.
41. CARMICHAEL, L.E.; 1990. *Brucella canis*. En: Nielsen, K. Duncan, J.R. *Animal Brucellosis*, CRC Press, Boca Ratón Fl.: 335-350.
42. CAPORALE, V.; BONFINI, B.; DI GIANNATALE, E.; DI PROVVIDO, A.; FORCELLA, S.; GIOVANNINI, A.; TITTARELLI, M.; SCACCHIA, M. 2010. Efficacy of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine *Brucella abortus* strain 19 in water buffalo. *Veterinaria Italiana.* 46 (1): 13-19.
43. CAPPARELLI, R.; ALFANO, F.; AMOROSO, M.; BORRIELLO, G.; FENIZIA, D.; BIANCO, A.; ROPERTO, S.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. 2007. Protective effect of the Nrampl genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infection and Immunity* (75) 2: 988-996.
44. CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; AMOROSO, M.; ROPERTO, S.; MARABELLI, R.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. 2008. Mannose-binding lectin haplotypes influence *Brucella abortus* infection in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Immunogenetics* 60: 157-165.
45. CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; IANNACCONE, M.; ROPERTO, S.; MARABELLI, R.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. 2009. Heterogeneous shedding of *Brucella abortus* in milk and its effect on the control of animal brucellosis. *J Appl Microbiol* 106: 2041-2047.
46. CELLI, J.; CHASTELLIER, C.; FRANCHINI, D.; PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J. 2003. *Brucella* evades Macrophage Killing via VirB-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum. *J. Exp. Med.* 198 (4): 545-556.
47. CHAIN, P.S.; COMERCI, D.J.; TOMALSKY, M.E.; LARIMER, F.W.; MALFATTI, S.A.; VERGEZ, L.M.; AGUERO, F.; LAND, M.L.; UGALDE, R.A. GARCÍA, E. 2005. Whole-Genome Analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect. Immun.* 73 (12): 8353-8361.
48. CHAND, P.; SADANA, J.R.; MALHOTRA, A.K. 2002. Epididymo-orchitis caused by *Brucella melitensis* in breeding rams in India. *Vet Rec* 150: 84-85.
49. CHRISTIE, T.E. 1969. Eradication of brucellosis in Northern Ireland: field problems and experience. *Vet Rec.* 10: 268-269.
50. CLOECKAERT, A.; KERKHOFS, P.; LIMET, J.N. 1992. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 42: 200-208.
51. CLOECKAERT, A.; TIBOR, A.; ZYGMUNT, M.S. 1999. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6(4): 627-629.

52. CORBEL, M. 1976. The immunogenic activity of ribosomal fractions derived from *Brucella abortus*. J. Hyg., Camb. 76: 65-74.
53. CORBEL, M. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3, 213:221.
54. CRAWFORD, R.P.; WILLIAMS, J.D.; HUBER, J.D.; CHILDERS, A.B. 1979. Biotypes of *Brucella abortus* and their value in epidemiologic studies of infected cattle herds. Journal of the American Veterinary Medical Association 175: 1274-1277.
55. CRESPO LEÓN, F. 1994. Brucelosis ovina y caprina. Office International des epizooties (OIE), Paris.
56. CRUDELLI, G.A.; MALDONADO VARGAS, P.; FLORES BARBARAN, S.M. "Reproduction of buffaloes in the northeast of Argentina". 1997. Proceedings 5th World Buffalo Congress. Caserta Italy: 779 - 782.
57. CRUDELLI, G.A., PATIÑO, E.M.; CEDRÉS, J.F.; GONZÁLEZ FRAGA, J.; MALDONADO VARGAS, P.; RACCIOPI, O.; ZAVA, M.; PELLERANO, G. 2004. El búfalo doméstico: Origen, distribución y razas. En: "Búfalos en Argentina". Moglia S. R. L Corrientes, Argentina: 9-23.
58. CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J. 2005. Brucellosis – new aspects of an old disease. Journal of applied microbiology, 98: 1270-1281.
59. DAS, V.; PARANJAPE, V.; CORBEL, M. 1990. Investigation of brucellosis-associated abortion in dairy buffaloes and cows in Bombay India. Indian Journal of Animal Science 60: 1193-1194.
60. DEHKORDI, F.S. 2012. Incidence study of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Bovine and Buffalo semen samples by Real-Time PCR assay in Iran. The Journal of Veterinary Medical Science (Advance Publication). 27 pp.
61. DENOEL, P.A.; ZYGMUNT, M.S.; WEYNANTS, V.; TIBOR, A.; LICHTFOUSE, B.; BRIFFEUIL, P.; LIMET, J.N.; LETESSON, J.J. 1995. Cloning and sequencing of the bacterioferritin gene of *Brucella melitensis* 16M strain. FEBS Letters 361: 238-242.
62. DETIELLEUX, P.G.; DEYOE, B.L.; CHEVILLE, N.F. 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immun 58: 2320-2328.
63. DRABNER, B.; GUZMAN, C.A. 2001. Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors. Biomol. Eng. 17: 75-82.
64. DRAGHI, M.G.; CETRÁ, B.; STORANI, C.; SALUSTIO, E.; SAMARTINO, L. 2000. Aislamiento de una cepa de *Brucella abortus* en un feto de búfala (*Bubalus bubalis*). Presentación en el III Congreso Argentino de Zoonosis del trabajo. Fac. Ciencias Veterinarias UBA. Buenos Aires, Argentina.
65. DRAGHI, M.G.; SANMARTINO, L.; ECHAIDE, S. T. DE; CONDE, S.; AGUIRRE, N.; PIAZZA, E.; BIOTTI, G.M.; SCHUST, M.; RAMIREZ, J.C.; RAMIREZ, L.M.; SOSA C.G.; PEREIRA, M. 2010. Persistencia de anticuerpos séricos en 3 biotipos: Hereford, 3/8 Hereford y 5/8 Cebú vacunados con *Brucella abortus* cepa 19 y RB51. Ediciones INTA, serie técnica N° 46: 1-15.
66. DUBRAY G., BEZARD G., 1980. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. Ann. Rech. Vet., 11: 367-373.
67. ELIASSON, M.; OLSSON, A.; PALMCRANTZ, E.; WIBERG, K.; INGANÄS, M.; GUSS, B.; LINDBERG, M.; UHLÉN, M. 1998. Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. The Journal of Biological Chemistry 263: 4323-4327.
68. ENRIGHT, F.M. 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. En: K. Nielsen and JR Duncan, Editors, Animal Brucellosis, CRC Press, Boca Raton: 301-320.
69. ESTEIN, S.M. 2006. Brucelosis: inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. VII (5). Website

www.veterinaria.org/revistas/redevet/n050506.html.

70. EWALT D.R.; BRICKER, B.J. 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. J Clin Microbiol.; 38:3085-6.
71. FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; SANBORN, M.R. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J. Appl. Bacteriol. 69: 216-227.
72. FERRAO-BECK, L.; CARDOSO, R.; MUNOZ, P.M.; DE MIGUEL, M.J.; ALBERT, D.; FERREIRA, A.C. 2006. Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. Vet Microbiol. 115:269-77.
73. FINLAY, B. B.; FALKOW, S. 1989. Common Themes in Microbial Pathogenicity. Microbiological reviews 53 (2): 210-230.
74. FIORENTINO, A.; TORIONI, S.; PAOLICCHI, F., CAMPERO, C., MALENA, R., ARESE, A., CRAVERO, S., ROSSETTI, O. 2005. Diagnóstico de *Brucella abortus* por PCR a partir de fluidos fetales bovinos: estudio preliminar. Memorias del XII Simposio Internacional de la Asociación Mundial de laboratorios de Diagnóstico Veterinarios, Montevideo, Uruguay: 195.
75. FITCH, T.A.; HUSSEINEN, H.S.; DERR, J.; BEARDEN, W. 1996. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* strains. International Journal of Systematic Bacteriology: 329-331.
76. FOSGATE, G.; ADESIYUN, A.; HIRD, D.; HIETALA, S.; RYAN, J. 2002. Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffaloes on Trinidad. Veterinary Record 151:272-273.
77. FOSGATE, G.; ADESIYUN, A.; HIRD, D.; JOHNSON, D.W.; HIETALA, S.; SCHURIG, G.G.; RYAN, J. 2003a. Estimation of receiver-operating characteristic curves to determine accuracy of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of *Brucella* infection in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle. Am. J. Vet. Res. 64: 57-64.
78. FOSGATE, G.; ADESIYUN, A.; HIRD, D.; JOHNSON, D.W.; HIETALA, S.; SCHURIG, G.G.; RYAN, J.; DIPTEE, M. 2003b. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine for domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. Preventive Veterinary Medicine 58: 211-225.
79. FOSGATE, G.; DIPTEE, M.; RAMNANAN, A.; ADESIYUN, A. 2011. Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. Trop Anim Hlt Prod. DOI 10.1007/s11250-011-9846-9.
80. FOSTER, G.; JAHANS, K.L.; REID, R.J.; ROSS, H.M. 1996. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and otter. Vet Rec; 138 (24): 583-586.
81. FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J. JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 2688-2693.
82. FOSTER, J.; BECKSTROM-STERMBERG, S.; PEARSON, T.; BECKSTROM-STERMBERG, J.; CHAIN, P.; ROBERTO, F. HNATH, J.; BRETTIN, T.; KEIM, P. 2009. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. J. Bacteriol. (191)8: 2864-2870.
83. FRETIN, D.; FAUCONNIER, A.; KÖHLER, S.; HALLING, S.; LÉONARD, S.; NIJSKENS, C.; FERROOZ, J.; LESTRATE, P.; DELRUE, R.; DANESE, I.; VANDENHAUTE, J.; TIBOR, A.; DEBOLLE, X.; LETESSON, J. 2005. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. Cell Microbiol 7:687-698.

84. GALL, D.; NIELSEN, K.; BERMUDEZ, M.R.; MORENO, F.; SMITH, P. 2002. Fluorescence polarization assay for detection of *Brucella abortus* antibodies in bulk tank bovine samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*: 9 (6): 1356-1360.
85. GARCIA-CARRILLO, C. 1982. Pruebas suplementarias para el diagnóstico de brucelosis. Nota técnica N° 25, Centro Panamericano de Zoonosis. 29 pp.
86. GARCIA-CARRILLO, C. 1990. Animal and human brucellosis in the Americas, 1st ed. OIE, Paris. France, 1: 4-30.
87. GARCÍA-CARRILLO, C.; LUCERO, N. 1993. Enfermedades de los bovinos. *Rev. Med. Vet.* 2: 16-27.
88. GIZINGER, D. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503-512.
89. GOMES CARDOSO, P.; COSTA MACEDO, G.; AZEVEDO, B.; COSTA OLIVEIRA, S. 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5:13.
90. GRINER, P.F.; MAYEWSKI, R.J.; MUSHLIN, A.I.; GREENLAND, P. 1981. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Intern. Med.* 94, 557-592.
91. GREINER, M.; GARDNER, I.A. 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* (45): 3-22.
92. GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. *RIA*, 35 (3): 133-153. INTA, Argentina.
93. HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
94. HÉNAULT, S.; CALVEZ, D.; THIÉBAUD, M.; BOULIÈRE, M.; GARIN-BASTUJI, B. 2000. Validation of a nested-PCR based on the IS6501/711 sequence for the detection of *Brucella* in animal samples. Proceedings of the Brucellosis 2000 International Research Conference 9I including the 53rd Brucellosis Reserach Conference; 2000 Sep 7-9; Nimes, France. Paris: INRA.
95. HERRMAN, H.; DEDEK, J. 1982. Enzyme immunoassay to detect antibodies in cattle sera against *Brucella abortus*. *Archiv fur experimentelle veterinary medizine* 36 (6): 871-875.
96. HILL, W. 1963. Standardization of the complement fixation test for brucellosis. *Bulle. OIE* 60: 401-410.
97. HUBER, J. NICOLETTI, P. 1986. Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring test with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1529-1531.
98. HUBER, B.; SCHOLZ, H.C.; LUCERO, N.; BUSSE, H.J. 2009. Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol.* 299:563-73.
99. HUDDLESSON, F.; ABELL, E. 1929. Rapid macroscopic agglutination for the serum diagnosis of Bang's abortion disease. *The Journal of Infectious Diseases* 42: 242-247.
100. HUNTER, D.; ALLAN, J. 1972. An evaluation of milk and blood tests used to diagnose brucellosis. *Vet. Rec.* 91: 310-312.
101. IMAOKA, K.; KIMURA, M.; SUZUKI, M.; KAMIYAMA, T.; YAMADA, A. 2007. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn J Infect Dis.* 60:137-9.
102. JACK, D.L.; READ, R.C.; TENNER, A.J.; FROSCH, M.; TURNER, M.W. 2001. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Infect. DIs.* 184; 1152-1162.
103. JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON; E.S. 1997. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Veterinary Microbiology* 57: 373-382.

104. JONES, S.M.; WINTER, A.J. 1992. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect Immun* 60: 3011-1014.
105. KATTAR, M.M.; ZALLOUA, P.A.; ARAJ, G.F.; SAMAHA-KFOURY, J.; SHBAKLO, H.; KANJ, S.SI. 2007. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59:23-32.
106. KEID, L.B.; SOARES, R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; CHIEBAO, D.P.; SALGADO, V.R.; MEGID, J. 2007. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology.* 68:1260-70.
107. KING, R. 1940. *Brucella* infection in the bull a progress report of mating experiments with naturally infected bull. *Aust. Vet. J.* 16:117-119.
108. KO, J.; SPLITTER, G.A. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical microbiology reviews,* 16 (1): 65-78.
109. KÖHLER, S.; MICHAUX-CHARACHON, S.; PORTE, F.; RAMUZ, F.; LIAUTARD, J. 2003. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*?. *Trends in microbiology* 11 (5): 215-219.
110. KUMAR, N.; MITRA, A.; GANGULY, I.; SINGH, R.; DEB, S.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, A. 2005. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)13 microsatellite allele at 30UTR of NRAMP1 gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cattle. *Veterinary microbiology* (111): 139-143.
111. LAMB, V.L.; JONES, L.M.; SCHURIG, G.G.; BERMAN, D.T. 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. And Immun.* 26 (1): 240-247.
112. LAMONTAGNE, J.; FOREST, A.; MARAZZO, E.; DENIS, F.; BUTLER, H.; MICHAUD, J.; BOUCHER, L.; PEDRO, I.; VILLENEUVE, A.; SITNIKOV, D.; TRUDEL, K.; NASSIF, N.; BOUDJELTI, D.; TOMAKI, F.; CHAVES-OLARTE, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; BRUNET, S.; CÔTÉ-MARTIN, A.; HUNTER, J.; MORENO, E.; PARAMITHIOTIS, E. 2009. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res* 8: 1594-1609.
113. LEAL-KLEVEZAS, D.S.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J.P. 1995a. Molecular detection of *Brucella* spp.: Rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Archives of medical research.* Vol. 26, N° 3: 263-267.
114. LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I.O.; LÓPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, J.P. 1995b. Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology:* 3087-3090.
115. LIN, J.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. 1992. Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infection and immunity* 60 (6): 2425-2431.
116. LOPEZ-GOÑI, I.; GARCIA-YOLDI, D.; MARIN, C.M.; DE MIGUEL, M.J.; MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 46:3484-7.
117. LUCERO, N.E., ESCOBAR, G.I., AYALA, S.M., PAULO, P.S., NIELSEN, K., 2003. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J. Med. Microbiol.* 52, 883–887.
118. MACKEON; F.W. 1976. A recent trial comparing two 45/20 adjuvant *Brucella* vaccines. *Dev. Biol. Stand.,* 31: 343–350.
119. MACKINNON, D. 1963. The complement fixation test in brucellosis. *Bull. OIE.* 60: 383-400.

120. MANTUR, B.; MANGALGI, S.; MULLIMANI, M. 1996. *Brucella melitensis*- a sexually transmissible agent? The lancet 347: 1763.
121. MARIANELLI, C.; LA ROSA, G.; CIUCHINI, F.; MUSCILLO, M.; PASQUALI, P.; ADONE, R. 2003. Genetic diversity at alkB locus in *Brucella abortus*. J. Vet. Med. 50: 494-499.
122. MARTIROSYAN, A.; MORENO, E.; GORVEL, J. 2011. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. Immunological Reviews 240: 211–234.
123. MATTAPALLIL, M.J.; ALI, S. 1999. Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationships between water buffalo (*Bubalus bubalis*) and sheep (*Ovis aries*). DNA and cell biology. 18: 513-519.
124. MAYER-SCHOLL A, DRAEGER A, GOLLNER C, SCHOLZ HC, NOCKLER K. 2010. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. J Microbiol Methods. 80:112-4.
125. MC GIVEN, J.A. TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A.P. 2003. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and iELISA. Journal of Immunological Methods 278: 171-178.
126. MEGID, J.; ALBERT, D.; FAGLIARI, J.; PAES, A.; LISTONI, F.; PINTO, M.; RIBEIRO, M. THIÉBAUD, M.; UENO, T.; GARIN-BASTUJI, B. 2005. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. Vet. Rec. 156: 147-148.
127. MEYER, M.; MORGAN, W.J. 1973. Designation of neotype strains and of biotype reference strains for species of the genus *Brucella* Meyer and Shaw. International Journal of Systematic Bacteriology: 135-141.
128. MORGAN, W. J. BRINLEY; MCDIARMID, A. 1960. The excretion of *Brucella abortus* in the milk of experimentally infected cattle. Research in Veterinary Science (1): 53-56.
129. METZ, C.E. 1978. Basic principles of ROC analysis. Semin. Nucl. Med. 8: 283–297
130. MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; JUMAS-BILAK, E.; GUIGUE-TALET, P.; ALLARDET-SERVENT, A.; O'CALLAGHAN, D. RAMUZ, M. 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 90: 209-227.
131. MOHAN, R.N. 1968. Diseases and parasites of buffaloes. The Veterinary Bulletin 38 (10): 647-659.
132. MONTAGNARO, S.; LONGO, M.; MALLARDO, K.; PISANELLI, G.; DE MARTINO, L.; FUSCO, G. BALDI, L. PAGNINI, U.; IOVANE, G. 2008. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Veterinary Immunology and Immunopathology N°125: 135-142.
133. MORENO E. 1998. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? FEMS Microbiol Rev 22: 255–275.
134. MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. Vet. Microbiol. 90: 209-227.
135. MORGAN, W.; MACKINNON, D.; LAWSON, J.; CULLEN, G. 1969. The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec., 85: 636–637.
136. MORIYON, I., GRILLO, M. J.; MONREAL, D., GONZALEZ, D., MARIN, C., LOPEZ-GONI, I., MAINAR-JAIME, R. C., MORENO, E., BLASCO, J. M. 2004. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet. Res. 35, 1-38.
137. MUNIR, R. 2009. Immune response of buffaloes against *Brucella abortus* vaccines. Tesis doctoral presentada en la Faculty of Sciences Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture University Rawalpindi. Pakistan: 163 pp.

138. MUÑOZ, P.M.; DE MIGUEL, M.J.; GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J.M. 2008. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine* 26: 2562-2569.
139. NICOLA A.M.; ELENA, S. 2009. Manual de Diagnóstico Serológico de la brucelosis bovina. SENASA-OIE. Laboratorio de Referencia de OIE para brucelosis. 95 pp.
140. NICOLETTI, P. 1967. Utilization of the card test in brucellosis eradication. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 151: 1778-1783.
141. NICOLETTI, P. 1969. Further evaluation of serologic procedures used to diagnose brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 30: 1811-1821.
142. NICOLETTI, P. 1976. Proceedings of the US Animal Health Association 80: 91.
143. NICOLETTI, P. 1980. The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in Veterinary Science and comparative Medicine*, 24: 69-98.
144. NICOLETTI, P. 1990. Vaccination against *Brucella*. *Advances in Biotechnological Processes* 13: 147-168.
145. NICOLETTI, P. 1992. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 24: 40-44.
146. NIELSEN, K.; CHERWONOGRODSKY, J.; DUNCAN, R.; BUNDLE, D. 1989. Enzyme immunoassay for the differentiation of antibody response of *Brucella abortus* infected and vaccinated cattle. *Am. J. Vet. Res.* 50: 5-9.
147. NIELSEN, K.H.; GALL, D.; KELLY, W.; HENNING, D.; GARCIA, M.M. 1992. Enzyme immunoassay: application to diagnosis of bovine brucellosis. Monograph. Agriculture Canada, Nepean, Ontario.
148. NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. 1996. A homogenous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, 195, 161-168.
149. NIELSEN, K. 1998. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* N°66: 321-389.
150. NIELSEN, K.; LIN, M.; GALL, D.; JOLLEY, M. 2000. Fluorescent polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods* 22: 71-76.
151. NIELSEN, K.; GALL, D. 2001. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J. Immunoassay* 22: 183-201.
152. NIELSEN, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 90: 447-459.
153. NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.; NICOLETTI, P.; ELZER, P.; VIGLIOCCO, A.; SILVA, P.; BERMUDEZ, R.; RENTERIA, T.; MORENO, F.; RUIZ, A.; MASSENGILL, C.; MUENKS, Q.; KENNY, K.; TOLLERSUD, T.; SAMARTINO, L.; CONDE, S.; DRAGHI DE BENITEZ, G.; GALL, D.; PEREZ, B.; ROJAS, X. 2004. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A- protein G as a common enzyme labelled detection reagent for sera for different animal species. *Veterinary Microbiology*, 101: 123-129.
154. NORMAN, G.; STREINER, D. 2000. Medidas de relación para datos con varias categorías. En: Norman, G.R.; Streiner, D.L (eds). *Bioestadística*. Mosby, pp 164-169.
155. OCAMPO-SOSA, A.A.; AGÜERO-BALBIN, J.; GARCIA-LOBO, J.M. 2005. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol.* 110:41- 51.
156. O'HARA, P. J.; CHRISTIANSEN, K. H. 1978. Investigation of abortions in brucellosis tested herds. *N Z Vet.J* 26:70-73.
157. OIE. 2000a. Manual of standards tests and vaccines. Bovine brucellosis. OIE, Paris: 475-489.

158. OIE. 2002a. Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Bovine brucellosis. OIE, Paris: 328-345.
159. OIE. 2000b. Manual of standards tests and vaccines. Caprine and ovine brucellosis. OIE, Paris: 328-345
160. OIE. 2008. Manual of standards tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Paris.
161. OSTERMAN, B.; MORIYON, I. 2003. Minutes of the meeting of International Committee on Systematic of Prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (56): 1173-1175.
162. PADILLA POESTER, F.; NIELSEN, K.; SANMARTINO, L.; YU, W. 2010. Diagnosis of brucellosis. The Open Veterinary Science Journal 4: 46-60.
163. PAPPAS, G.; PAPADIMITROU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; EPAMEINONDAS, T. 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 2006; 6: 91-99.
164. PHILIPPON, A. ; RENOUX, G. AND PLOMMET, M. 1971 a. Brucelloses bovine expérimentale. Excrétion de *Brucella abortus* par le colostrum et le lait. Infection par *Brucella abortus* des veaux a la naissance. Ann. Rech. Vet. 2:59-76.
165. PIZARRO-CERDA, J.; MORENO, E.; GORVEL, J. 2000. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. Microbes and Infection, 2 (7): 829-835.
166. PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; RENOUX, G.; GESTIN, J. AND PHILIPPON, A. 1973. Brucelosis bovine experimentale. XII. Persistence a l'age adulte de l'infection congenitale de la genisse. Ann. Rech. Vet. 4:419-435.
167. PLOMMET, M.; PLOMMET, A.M.; BOSSERAY, N. 1982. L'évolution de la brucellose chronique de la souris n'est pas améliorée par l'administration d'un antigène vaccinal. Ann Rech Vet 13: 127-132.
168. PLOMMET, M.; PLOMMET, A.M. 1988. Virulence of *Brucella*: bacterial growth and decline in mice. Ann Rech Vet 19: 65-67.
169. PLOMMET M. 1990. Killed vaccines in cattle: current situation and perspectives. Pp 215-227. En: Advances in brucellosis research. L.G. Adams (Ed.) Texas A & M University Press, College Station.
170. PROMEGA CORPORATION. 2010. Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. 27 pp.
171. QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; COLMENERO, J.D.; REGUERA, J.M.; GARCÍA-ORDOÑEZ, M.A.; PACHON, M.E.; GONZALEZ, M. 2005. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. Clin Microbiol Infect.11:713- 8.
172. REDKAR, R.; ROSE, S.; BRICKER, B.; DELVECCHIO, V. 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes. 15:43-52.
173. REES RK, GRAVES M, CATON N, ELY JM, PROBERT WS. 2009. Single tube identification and strain typing of *Brucella melitensis* by multiplex PCR. J Microbiol Methods. 78:66-70.
174. RENUKARADHYA, G.J.; ISLOOR, S.; RAJASEKHAR, M. 2002. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. Veterinary Microbiology 90: 183-195.
175. RIBEIRO, L. A.; AZEVEDO, V.; LE LOIR, Y.; OLIVEIRA, S. C.; DIEYE, Y.; PIARD, J. C.; GRUSS, A.; LANGELLA, P. 2002. Production and targeting of the *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. Applied and environmental microbiology 68 (2): 910-916.

176. RIJPENS, N.P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M.; ROSSAU, R.; HERMAN, L.M. 1996. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol.* 62:1683-8.
177. RILEY, L.K.; ROBERTSON, D.C. 1984. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect immune* 46: 224-230.
178. RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P; WITTEWER, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
179. ROMERO C, GAMAZO C, PARDO M, LOPEZ-GOÑI I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol.* 33:615-7.
180. ROSE, J.; ROEPKE, M. 1964. Physicochemical properties of nonspecific bovine seroagglutinins for *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 25: 325-328.
181. ROSINHA, G. M. S.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V.; SPLITTER, G.A.; OLIVEIRA, S.C. 2002. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when coadministered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J. Med. Microbiol.* 51: 661–671.
182. ROSSETTI, O.L.; ARESE, A.I.; BOSCHIROLI, M. L.; CRAVERO, S.L. 1999. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-Kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*: 165–169.
183. RUSSO, A.; AGUIRRE, N.; MANCEBO, O.; MONZÓN, C.M.; TORIONI DE ECHAIDE, S. 2010. Estudio epidemiológico de la brucelosis bovina en rodeos de cría de la provincia de Formosa: evaluación de las técnicas de Polarización Fluorescente y ELISA de competición. *Revista de Medicina Veterinaria* 91: 4-8.
184. SAEGERMAN, C.; VO, T.K.; DE WAELE, L.; GILSON, D.; BASTIN, A.; DUBRAY, G.; FLANAGAN, P.; LIMET, J.N.; LETESSON, J.J.; GODFROID, J. 1999. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet Rec* 145, 214 – 218.
185. SALCEDO, S.P.; MARCHESINI, M.I.; LELOUARD, H.; FUGIER, E.; JOLLY, G.; BALOR, S.; MULLER, A.; LAPAQUE, N.; DEMARIA, O.; ALEXOPOULOU, L.; COMERCI, D.; UGALDE, R.; PIERRE, P.; GORVEL, J. 2008. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp-1. *PLoS Pathog* 4: 213-217.
186. SALHI, I.; BOIGERGRAIN, R.A.; MACHOLD, J.; WEISE, C.; CLOECKAERT, A.; ROUOT, B. 2003. Characterization of new members of the group 3 Outer Membrane Protein family *Brucella* spp. *Infection and immunity*: 4326-4332.
187. SAMARTINO, L. 2002. Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology* 90: 71-80.
188. SANGARI, F.; GARCÍA-LOBO, J.M.; AGÜERO, J. 1994a. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiology letters* N° 121: 337-342.
189. SANGARI, F.J.; AGÜERO, J. 1994b. Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine.* 12:435-8.
190. SCHOONJANS, F., 2005. Receiver operator characteristics (ROC) curve analysis. *MedCalc Statistics for biomedical sciences. Software Manual.*
191. SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* 90 (1–4): 479–496.
192. SENACSA, 2000. Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina. Años 2000-2004. Servicio Nacional de Salud Animal (SENACSA). Ministerio de Agricultura y Ganadería. República del Paraguay.

193. SENASA (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA). Programa de control y erradicación de la brucelosis bovina en Argentina. Resoluciones Nacionales N° 115/1999, 150/2002, 725/2005, 438/2006 y 023/2007.
194. SOLARES JUÁREZ, V.Z. 2003. Determinación del perfil vitamínico de cuatro materiales de maíz amarillo (*Zea mays* L.) con fines de alimentación animal. Tesis Licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 35 pp.
195. SPINK, W.W. 1956. Nature of Brucellosis. Minneapolis: The University of Minnesota Press: 3-27, 446.
196. STABLEFORTH, A. W.; JONES, L.M. 1962. Report of the Subcommittee on Taxonomy of the Genus *Brycekkia*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 13: 145-158.
197. SUTRA, L.; CAFFIN, J.; DUBRAY, G. 1986. Role of milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. Vet. Microbiol. 12: 359-368.
198. TAKAHASHI, K.; SHI, L.; GOWDA, L.D.; EZEKOWITZ, R.A. 2005. Relative roles of complement factor 3 and mannose-binding lectin in host defense against infection. Infect. Immune. 73: 8188-8193.
199. TARABLA, H. 2000. Epidemiología Diagnóstica. Centro de Publicaciones, 120 pp.
200. THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C.M.; SCHWAEBLE, W.; LAURSEN, S.B.; POULSEN, K.; WILLIS, A.C.; EGGLETON, P.; HANSEN, S.; HOLMSKOV, U.; REID, K.B.; JENSENIUS, J.C. 1997. A second serine protease associated with mannanbinding lectin that activates complement. Nature 386: 506-510.
201. THOMSEN, A. 1943. Does the bull spread infectious abortion in cattle? Experimental studies from 1936 to 1942. J. Pathol. 53:199-211.
202. TIZARD, I. R. 1979. Identificación y medición de la respuesta inmune humoral. En TIZARD, I. R. (Ed.) Inmunología Veterinaria. 1ª Ed. Interamericana. México, pp. 119-155.
203. TOBIAS, L.; CORDES, D.O.; SCHURIG, G.G. 1993. Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. Vet Pathol 30: 119-129.
204. UGALDE, R.A. 1999. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. Microbes and Infection, 1: 1211-1219.
205. VEMULAPALLI, R.; MCQUISTON, J.R.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clin Diagn Lab Immunol. 6: 760-764.
206. VERGER J.M.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; GRAYON, M. 1985. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol 35: 292-295.
207. VERGER, J.M.; GARIN-BASTUJI, B.; MAHÉ, A.M.; GRAYON, M. 1989. Bovine brucellosis caused by *Brucella melitensis* in France. Annales de Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research, 20(1): 93-102.
208. VERSTREATE, D. R.; CREASY, M. T.; CAVENEY, N. T.; BALDWIN, C. L.; BLAB, M. W.; WINTER, A. J. 1982. Outer Membrane Proteins of *Brucella abortus*: Isolation and Characterization. Infection and immunity: 979-989.
209. VIZCAINO, N.; CARO-HERNANDEZ, P.; CLOECKAERT, A; FERNANDEZ-LAGO, L. 2004. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. Microbes Infect. 6: 821-834.
210. WALSH, A. I.; GIMENO, E. J. 1980. Situación de la brucelosis en la Argentina y en la provincia de Buenos Aires. Simp. Nac. brucelosis, La Plata: 63-68.

211. WEISS, D.S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E. 2005. MyD88, but not toll-like receptors 1 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 73: 5137-5143.
212. WINCHELL, J.M.; WOLFF, B.J.; TILLER, R.; BOWEN, M.; HOFFMASTER, A. 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*: 697-702.
213. WORTHINGTON, R.W.; MÜLDERS, M.S.; MCFARLANE, I.S.; BECKER, D. 1973. A serological investigation on adult cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 40 (1):7-12.
214. WRIGHT, A.E.; SMITH, F. 1897. On the application of the serum test to the differential diagnosis of thypoid and Malta fever. *Lancet* 1: 656-659.
215. WYCKOFF, J. H. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* 90, 395-415.
216. YU, W.L.; NIELSEN, K. 2010. Review of detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. *Croat Med J.*; 51: 306-313.
217. ZAVA, M. 2004. El búfalo doméstico. En: CRUDELI, G. (Ed.) *Búfalos en Argentina*. Ed. Moglia: 17-53.
218. ZHAN, Y.; CHEERS, C. 1995. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 63, 1387-1390.
219. ZWEIG, M.; CAMPBELL, G. 1993. Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 39 (4): 561-577.
220. ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A.; DUBRAY, G. 1994. *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral immune responses and experimentally infected sheep. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2154-2522.

APÉNDICE

1. Procedimientos para la realización de las técnicas de diagnóstico serológico de brucelosis

1.1. Fijación del Complemento

Todos los reactivos C', Ag, SH fueron estandarizados frente al Segundo Suero Patrón Internacional anti *B. abortus* (PISAb) para determinar el título a utilizar en la prueba de FC. El suero control positivo fue homologado con el mismo suero patrón.

- a) Se inactivó el C' de los sueros controles y problema, en Baño de María a 58°C.
- b) Se colocaron 25 µl de buffer Veronal en cada pocillo de una placa de microdilución de 96 pocillos con fondo en U.
- c) Se sembraron 25 µl de cada suero problema en la hilera inicial de cada placa (12 sueros por placa) y luego se realizaron diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:256. Se eliminaron los últimos 25 µl de la última dilución para mantener el volumen. En una placa "control" se diluyeron de la misma manera los sueros controles positivo y negativo y se agregaron los controles de 5, 2,5, 1 y ½ UC', además de los controles de Ag en dilución predeterminada con cada una de esas diluciones de C' (OIE, 2008).
- d) Se adicionaron en cada pocillo 25 µl de C' de cobayo.
- e) Se adicionaron 25 µl de Ag excepto en la primera hilera la cual se reemplazó el volumen por buffer Veronal. Esta hilera es un indicador de la actividad anticomplementaria de los sueros, relacionado a la calidad de los mismos y al valor de un resultado.
- f) Las placas se incubaron a 37°C, en agitación, durante 30 minutos en incubadora.
- g) En forma paralela se preparó el SH y se incubó a 37°C, durante 30 minutos en baño de María.
- h) Luego se agregaron 25 µl del SH a todos los pocillos de la placa, las que se incubaron a 37°C durante 30 min con agitación a los 15 min.
- i) Luego las placas se refrigeraron a 4°C, por al menos 2 horas, para permitir la sedimentación de los glóbulos rojos y proceder a la lectura.
- j) Los resultados se expresan en UIFC respecto del PISAb (Weybridge Laboratory, Surrey, UK; Alton, 1988), según la siguiente fórmula ($UI = \text{dilución} \times 1000 \text{ UI}/256$). La conversión de los títulos en Unidades Internacionales Fijadoras de Complemento (UIFC) se expresa en la tabla 1. Títulos ≥ 41 UIFC se consideraron positivos (Nicola y Elena, 2009). Se consideraron títulos bajos a aquellos ≤ 83 UIFC, títulos medios a aquellos comprendidos entre 106 y 331 UIFC y títulos elevados a ≥ 425 UIFC.

Tabla I. Conversión de títulos en UIFC.

Dilución	Grado de Fijación	UI
	+	13
1:4	++	16
	+++	17
	++++	20
	+	27
1:8	++	31
	+++	36
	++++	41
	+	53
1:16	++	63
	+++	72
	++++	83
	+	106
1:32	++	125
	+++	144
	++++	165
	+	213
1:64	++	250
	+++	288
	++++	331
	+	425
1:128	++	500
	+++	662
	++++	760
	+	850
1:256	++	1000
	+++	1150
	++++	1323

Fuente: Morgan *et al.*, 1971

1.2. Técnica del Antígeno Bufferado en Placa

- a) Se colocaron las muestras de suero y el antígeno a temperatura ambiente ($22 \pm 4^\circ\text{C}$).
- b) Se agitaron bien las muestras. Se colocaron 80 μl de cada muestra de suero en una placa de vidrio marcada con cuadros de 4×4 cm.
- c) Se agitó bien la botella de antígeno, y se colocaron 30 μl de antígeno cerca de cada gota de suero.
- d) Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno a la placa, se mezclaron completamente el suero y el antígeno (utilizando una varilla de plástico para cada prueba) hasta producir una zona circular de aprox. 3 cm de diámetro.
- e) Después de la mezcla inicial, se rotó la placa tres veces para asegurar la dispersión homogénea de los reactivos y se incubó 4 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- f) Se extrajo la placa y se rotó como antes, incubando otros 4 minutos.
- g) Se realizó de inmediato la lectura de la aglutinación una vez transcurridos 8 minutos.

Cualquier reacción visible se consideró positiva. Se procedió de igual manera con un suero control que dio una reacción positiva mínima antes de comenzar las pruebas de cada día para comprobar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

1.3. Seroaglutinación en Tubo o Prueba de Wright (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2ME)

Procedimiento de las pruebas:

Ambas se realizaron en simultáneo, de la siguiente manera:

- a) Se descongelaron y mezclaron los sueros.
- b) Se llevaron las muestras de suero y de antígeno a temperatura ambiente de $22 \pm 4^\circ\text{C}$
- c) Se homogeneizó el antígeno agitando suavemente por inversión durante 10 minutos.
- d) Se colocaron en gradilla, por cada muestra de suero positiva a BPA, 2 hileras de 4 tubos cada una y se identificó cada línea con el número correspondiente al suero problema. Una de las hileras se destinó a la prueba de 2-mercaptoetanol y la otra a SAT.
- e) Por cada muestra de suero se descargaron con micropipeta 80 μl de suero del fondo del primer tubo, 40 μl en el segundo, 20 μl en el tercero y 10 μl en el cuarto. Este proceso se repitió en ambas filas de tubos.
- f) Se incluyeron sueros controles positivo y negativo y un control de soluciones sin suero.
- g) Se agregó, con micropipeta, 1 ml de solución de Dosmercaptoetanol a las hileras que corresponden a esta técnica y 1 ml de solución salina fenolada a las hileras que corresponden a la prueba de SAT.

- h) Se dejaron las gradillas con las muestras a temperatura ambiente de $22 \pm 4^\circ\text{C}$ durante 45 a 60 minutos y posteriormente se adicionó 1 ml de antígeno diluido al 2% en solución salina fisiológica.
- i) Se mezcló por agitación.
- j) Se incubó durante 40-48 hs a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ con el objeto de que ocurra la reacción de aglutinación.
- k) Se realizó la lectura contra un fondo negro opaco, iluminando con una fuente de luz que atravesara los tubos, observándose la ocurrencia de aglutinación bajo la forma de grumos que se depositan en el fondo del tubo por gravedad, pero que se mantienen firmes luego de una leve agitación del tubo.
- l) Interpretación de resultados: el título se corresponde con la dilución del último tubo donde se presentó aglutinación. El grado de aglutinación se clasificó como completo (+), incompleto (I) o negativo (-). Aglutinación completa es aquella en que el líquido aparece límpido y la agitación suave no rompe los grumos; incompleta es cuando la mezcla permanece turbia parcialmente, pero una suave agitación no rompe los grumos y aglutinación negativa cuando la mezcla aparece turbia y una suave agitación no revela grumos.

1.4. Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA)

Procedimiento de la prueba:

- a) Se colocó 1 ml de solución tampón de dilución de sueros en los tubos de vidrio de borosilicato (10 x 75 mm).
- b) Se adicionaron 10 μl de los sueros a analizar dentro de los tubos y se mezclaron con vortex. Se dejó equilibrar durante aproximadamente 2 minutos.
- c) Se procedió a la lectura “en blanco” de las muestras.
- d) Se agregaron 10 μl de antígeno conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se dejó equilibrar durante aproximadamente 2 minutos para permitir la interacción entre antígeno y anticuerpo.
- e) Se leyeron las muestras en el equipo exactamente en el mismo orden en que fueron “blanqueadas”.
- f) En cada serie de pruebas se incluyó un suero estandarizado de trabajo fuertemente positivo, otro débilmente positivo y un suero negativo, todos ellos calibrados frente a los Sueros Estándar de OIE. Los resultados se expresaron para FPA en unidades de milipolarización (UmP).

1.5. Enzimoimmunoensayo de Competición (ELISA-c)

Los pasos de la técnica fueron (OIE, 2008):

- a) Se antigenizaron las microplacas añadiendo a todos los pocillos 100 µl de solución de sLPS liofilizado reconstituido en 1 ml de agua destilada. Las placas así sembradas fueron a incubación durante 18 hs a 4°C y luego fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.
- b) Se diluyeron de los sueros 1/10 con EDTA en una placa con fondo en “U”.
- c) Se lavó tres veces la placa para ELISA (con antígenos de *Brucella* adheridos) con PBS Tween.
- d) Se colocaron 50 µl del suero diluido en cada well (o pocillo) de la placa de ELISA.
- e) Se lavó tres veces.
- f) Se colocaron 50 µl de suero anti-*Brucella* de cobayo. Se mezcló en agitador.
- g) Se lavó tres veces cada well.
- h) Se colocó conjugado cromógeno (sustancia que se une a los complejos antígeno-anticuerpo, dando color y señalando los porcentajes de unión).
- i) Se añadieron a las placas, por duplicado, los sueros controles fuertemente positivo, débilmente positivo, negativo (calibrados con Sueros Estándar OIE) y control del tampón. Los pocillos control con suero fuertemente positivo se consideraron como una inhibición de 0% y los datos se calcularon a partir de estas lecturas de absorbancias.
- j) Se procedió a la lectura de la reacción en computadora, que procesó los datos mediante el programa “Speia 1.03”.

1.6. Enzimoimmunoensayo Indirecto (ELISA-i)

Los pasos esenciales de esta técnica fueron (OIE, 2008):

- a) Las microplacas fueron antigenizadas y conservadas de la manera descrita para ELISA-c.
- b) Se diluyeron de los sueros 1/50 con EDTA/EGTA Se realizó una predilución de 1/10 en una placa de microdilución con fondo en “U” (10µl suero/90µl buffer).
- c) Con una pipeta multicanal se pasaron los sueros prediluidos 1/10 a una placa de ELISA cargada con buffer EDTA/EGTA para llegar a la dilución final 1/50 (dilución 1/5) en un volumen de 100µl (20µl suero 1/10: 80µl buffer).
- d) Se agregaron a las placas, por duplicado, los sueros controles fuertemente positivo, débilmente positivo, negativo (calibrados con Sueros Estándar OIE) y control del tampón. Se incubó en agitador durante 30 minutos.
- e) Se lavó tres veces la placa con PBS Tween.

- f) Se adicionaron a cada pocillo 100 µl del conjugado* y se incubaron las placas 30 minutos a temperatura ambiente.
- g) Se lavó tres veces, como en e).
- h) Se agregaron 100 µl de sustrato/cromógeno. Las placas se agitaron durante 10 minutos.
- i) Los pocillos control con suero fuertemente positivo se consideraron como una positividad de 100% y los datos se calculan a partir de estas lecturas de absorbancias
- j) Se procedió a la lectura a 405 nm en un lector de ELISA mediante el programa “Speia 1.03”.

* M23-Peroxida o proteína A/G-Peroxidasa

2. Pasos de la obtención de ADN para la realización de las técnicas moleculares

2.1. Obtención de ADN a partir de sangre entera

Se tomaron muestras de sangre con citrato de sodio 3,4 M como anticoagulante. Las muestras se acondicionaron en alícuotas de 2 ml y se congelaron, hasta su procesamiento.

Procesamiento:

- a) Se descongelaron las muestras de sangre
- b) Se colocaron 800 µl de cada muestra en tubos Eppendorf.
- c) Se agregaron 1000 µl de “buffer lisis de glóbulos rojos”. Se mezclaron por inversión, se incubaron 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 9,3 xg por 15 min.
- d) Se removió cuidadosamente el sobrenadante preservando el sedimento y algo del líquido que lo cubre.
- e) Se adicionaron 1000 µl de agua destilada, mezclando bien para lavar el sedimento y se volvió a centrifugar a 9,3 xg por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado resuspendiendo el sedimento, hasta obtener un sobrenadante claro-transparente.
- f) Se agregaron 400 µl de “buffer lisis celular” y 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló muy bien despegando el sedimento y luego se incubó 2 horas entre 58° y 62 °C.
- g) Las muestras se refrigeraron 5-10 min y luego se adicionaron 200 µl de CINa 5M y 400 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1). Se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10-15 min a 16,1 xg a 4-8°C.
- h) Se colocaron en otros tubos Eppendorf de 1,5 ml correctamente identificados, 400 µl de isopropanol y el sobrenadante de los tubos del paso anterior. Se agitaron 50 veces para favorecer la precipitación del ADN que generalmente se visualiza como pequeños ovillos de DNA. Las muestras se incubaron por 1 hora a -20°C y luego se

centrifugaron 2 min a 14.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar boca abajo.

- i) Se agregaron 400 µl de ethanol 75%, se enjuagó el ADN y se centrifugó a 16,1 xg por 2 min. Se dejaron secar boca abajo.
- j) El ADN se resuspendió en agua destilada pura o bidestilada (100-200 µl).

2.2. Obtención de ADN a partir de leche

La leche se fraccionó en alícuotas de 50 ml en tubos de centrífuga y se acondicionaron mediante centrifugación a 4,0 xg y eliminación de la columna líquida. Una vez homogeneizada la grasa y el sedimento se centrifugó nuevamente y se almacenaron en viales de 2 ml a -20°C hasta su procesamiento.

Procesamiento

- a) Los tubos conteniendo la muestra de grasa y sedimento de leche se descongelaron.
- b) Se tomaron 500 µl y se colocaron en un vial de 2 ml. Se agregaron 500 µl de buffer lisis y se incubaron 30 min a 65°C en agitación. Luego se agregaron 20 µl de proteinasa K (10mg/mL) y se incubaron, como mínimo, 45 min.
- c) Se incubaron 10 min a 100°C.
- d) Se agregaron 200 µl de NaCl 5M.
- e) Se realizaron dos extracciones con igual volumen (500 µl) de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (F/Cl/I) 24:24:1. Las muestras se mezclaron por inversión aproximadamente treinta veces y luego se centrifugó durante 10 min. a 13,4 xg. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se agregó un nuevo volumen de F/Cl/I y se procedió de la misma manera. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.
- f) Se agregaron 500 µl de isopropanol e incubó a -20°C toda la noche.
- g) Los tubos se centrifugaron a 13,4 xg 15 min, se descartó el sobrenadante y realizaron dos lavados con etanol 70% frío.
- h) Se centrifugó 10 seg., se eliminó el exceso de alcohol con pipeta y dejó secar a 65°C durante 5 min.
- i) Se resuspendió en 100 o 200 µl de agua dependiendo de la viscosidad de la solución.

2.3. Obtención de ADN a partir de tejidos animales

La recolección de las muestras se realizó en forma rápida y fueron luego mantenidas en hielo. El material se colocó en tubos estériles y se envió al laboratorio refrigerado o congelado. Se tomaron 10-20 mg de tejido fresco y se colocaron en bolsitas de polietileno para su

trituration con un triturador mecánico Stomacher®. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Procesamiento

- a) Se tomó una alícuota de 500 µl de tejido triturado y se incubó a 65°C durante 15 min. Se agregaron 8-10 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se mezcló muy bien despegando el sedimento e incubó 3 hs a 58°C.
- b) Como paso optativo, se agregaron 3 µl de RNAsa. La muestra se mezcló e incubó a 37°C por 15-60 min y luego se centrifugó a 16,1 xg.
- c) Se agregaron 100 µl de ClNa 5M, se mezclaron y agregaron 500 µl de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:24:1). Se mezcló en vórtex y se centrifugó a temperatura ambiente a 16,1 xg.
- d) En otros tubos eppendorf se colocaron 500 µl de isopropanol y se agregó la fase acuosa del tubo anterior. Se mezclaron suavemente 50 veces hasta formar los ovillos de ADN. Se centrifugaron 2-3 min a 16,1 xg, se volcó el sobrenadante y se dejaron boca abajo para que se secaran.
- e) Se agregaron 500 µl de ethanol 75% se enjuagó el ADN para luego centrifugar a 16,1 xg por 2-3 min. Se dejaron secar boca abajo.
- f) El ADN se resuspendió en 100 µl de agua destilada pura o bidestilada o en buffer TrisEdta.

2.4. Obtención de ADN a partir de secreciones

Las suspensiones producto de los hisopados en buffer lisis celular fueron procesadas como se describe comenzando en el paso c) para extracción de ADN a partir de tejidos.

3. Pasos de la clonación en vectores de fragmentos de genoma de *Brucella* spp. para su posterior secuenciación

3.1. Ligación

- a) Se centrifugó ligeramente el vector pGEM®-T Easy.
- b) Se inició la reacción utilizando 5 µl de buffer de ligado rápido 2X homogeneizado, 1 µl del vector pGEM®-T, 2 µl del producto de PCR, 1 µl de T4 ADN ligasa, agua libre de nucleasa hasta un volumen final de 10 µl.
- c) Se mezclaron los componentes de la reacción y se incubó durante toda la noche a 4°C.

3.2. Transformación

- a) Se prepararon dos placas con medio de cultivo específico para *E. coli* LB/ampicilina/IPTG/X-Gal por cada reacción de ligación.

- b) Se centrifugaron los tubos con los componentes de la reacción para colectar desde el fondo de los mismos.
- c) Se descongelaron tubos (cada uno conteniendo 50 µl de suspensión de células) de *Escherichia coli* Top10F' (Invitrogen®) para su almacenamiento, colocándolos previamente en un baño de hielo por aproximadamente 5 minutos. Se mezclaron las células mediante agitación suave.
- d) Se adicionaron 3 µl del mix de ligado en cada tubo.
- e) Se agitaron suavemente los tubos y los colocó en hielo por 20 minutos.
- f) Se les dio luego un golpe de calor durante 45-50 segundos en un baño de agua a 42 °C, evitando agitar.
- g) Inmediatamente se colocaron los tubos en hielo por 2 minutos.
- h) Se adicionaron 950 µl de medio LB a temperatura ambiente a los tubos que contenían las células transformadas mediante las reacciones de ligación.
- i) Se incubó por 1,5 horas a 37°C en agitación (~150rpm).
- j) Se sembró 100 µl de cada cultivo de transformación en placas con LB/ampicillin/IPTG/X-Gal.
- k) Se incubaron las placas durante toda la noche (16-24 horas) a 37°C. Sembrando 100 µl, se ven rutinariamente 100 colonias por placa. Puede recurrirse a una incubación más prolongada o al almacenamiento de las placas a 4°C (después de la incubación a 37°C) para facilitar el desarrollo de color azul. Las colonias blancas son aquellas que generalmente contienen insertos, sin embargo, los insertos también pueden estar presentes en las colonias azules.

3.3. Búsqueda de bacterias transformantes con insertos

- a) Los clones conteniendo los productos de PCR produjeron colonias blancas. Se chequeó la positividad o negatividad para la inserción del ADN por PCR.

3.4. Purificación

- a) Los clones positivos fueron cultivados en tubos de 15 ml, con 3 ml de medio LB/Ampicilina e incubados toda la noche a 37°C.
- b) Las células que contenían el inserto fueron purificadas mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega®).

Tabla II. Tipos de PCR, regiones amplificadas, proteína codificada por la región cromosómica y especificidad de cada técnica utilizada para el diagnóstico de brucelosis.

Tipo de PCR	Regiones amplificadas (loci)	Proteína que codifica	Detecta	
Simple (un solo par de primers)	BCSP 31	Antígeno de superficie de 31 kDa de <i>B. abortus</i>	Género <i>Brucella</i> (Baily <i>et al.</i> , 1992)	
	16SrRNA	Porción de Secuencia ribosomal	Género <i>Brucella</i> (Romero <i>et al.</i> , 1995)	
	16s-23S espaciadores intergénicos (ITS)	16S-23S-transcriptos	Operón rRNA. Secuencia espaciadora de aprox. 800 pb con muy alta homología entre especies de <i>Brucella</i>	Género <i>Brucella</i> (Rijpens <i>et al.</i> , 1996; Bricker <i>et al.</i> , 2000)
	16S-23S interespacio (ITS)	rDNA	Región espaciadora ribosomal	Género <i>Brucella</i> (Keid <i>et al.</i> , 2007)
	IS711		Inserción con número variable de copias, altamente conservada entre especies de <i>Brucella</i>	Género <i>Brucella</i> (Hénault <i>et al.</i> , 2000)
	per		Perosamina sintetasa, implicada en la síntesis de la Cadena "O"	Género <i>Brucella</i> (Bogdanovich <i>et al.</i> , 2004)
	omp2		Proteína de membrana externa	Género <i>Brucella</i> (Leal-Klevezas <i>et al.</i> , 1995b)
	omp2b, omp2a y omp31		Proteínas de membrana externa	Género <i>Brucella</i> (Imaoka <i>et al.</i> , 2007)

	omp25/omp31	Proteínas de membrana externa	Género <i>Brucella</i> (Vizcaino <i>et al.</i> , 2004)
	ery	Molécula implicada en metabolismo del eritritol	Cepa 19 de <i>B. abortus</i> (Sangari <i>et al.</i> , 1994)
	wboA	Glicosiltransferasa, enzima esencial para el desarrollo del antígeno "O"	Cepa RB51 de <i>B. abortus</i> (Vemulapalli <i>et al.</i> , 1999)
Múltiplex (AMOS PCR)	IS711	Inserto conservado en <i>Brucella</i> , que varía entre especies y biotipos.	<i>B. abortus</i> (biovares 1,2 y 4), <i>B. melitensis</i> (biovares 1,2 y 3), <i>B. ovis</i> (biovar 1) y <i>B. suis</i> (biovar 1) (Bricker y Halling, 1994)
	IS711	Inserto conservado en <i>Brucella</i> , que varía entre especies y biotipos.	Todas las especies y biovares anteriores más cepas vacunales S19 y RB51 de <i>B. abortus</i> . (Ewalt y Bricker, 2000)
	IS711	Inserto conservado en <i>Brucella</i> , que varía entre especies y biotipos.	Todas las especies y biovares

				anteriores, cepas vacunales S19 y RB51 de <i>B. abortus</i> y biovares 3b, 5, 6 y 9 de <i>B. abortus</i> (Ocampo-Sosa <i>et al.</i> , 2005)
Múltiplex (<i>B. abortus</i> species specific PCR assay- BaSS)	Una región correspondiente al locus 16S. Una región del locus <i>alkB</i> Una región del locus <i>wboA</i> Una región del locus <i>eryCD</i>	Proteína ribosomal usada como control interno. Gen reparador de ADN (específico de <i>B. abortus</i>) Glicosiltransferasa, enzima que interviene en síntesis del antígeno "O" (específico de RB51) Enzima catabolizadora de eritritiol (común a todo <i>Brucella</i> excepto S19)	<i>B. abortus</i> biovares 1, 2 y 4, cepas vacunales, otras especies de <i>Brucella</i> y otras bacterias que pueden dar reacción cruzada (Bricker <i>et al.</i> , 2003)	
Multiplex	<i>omp2b</i>	Proteínas de membrana externa, que presentan variabilidad entre biovares	<i>B. suis</i> biovares 1,2 y 3 (Ferrao-Beck <i>et al.</i> , 2006)	
Múltiplex – MLVA (multi-locus variable number tandem repeat analysis)	Secuencias repetitivas en el genoma	Ocho loci dentro del genoma: Dos de ellos son especie- específicos de <i>B. melitensis</i> y <i>B. abortus</i> Los seis restantes son loci moderadamente variables capaces de distinguir entre cepas de <i>B. melitensis</i>	Distingue <i>B. melitensis</i> de otras especies de <i>Brucella</i> . Tipifica cepas. (Rees, <i>et al.</i> 2009)	
Multiplex –	Gen <i>wboA</i>	Glicosiltransferasa	Diferencia	

Bruce ladder	Gen <i>bp26</i> Gen <i>omp31</i> Polisacárido-diacetilasa Gen <i>eryC</i> Locus ABC protein Gen <i>rpsI</i> Locus <i>CRP</i>	Antígeno inmunodominante Proteína de membrana externa Enzima catabolizadora Catabolizador de eritritol Proteína de unión Proteína ribosomal Regulador de la transcripción	<i>Brucella</i> en las 6 especies terrestres, las especies marinas y las cepas vacunales S19, RB51 y Rev1 (Lopez-Goñi <i>et al.</i> , 2008)
Multiplex – Bruce ladder	Varias secuencias repetitivas pertenecientes a las distintas especies	Distintos fragmentos, cuyas combinaciones distinguen entre especies y biotipos.	Las 9 especies conocidas de <i>Brucella</i> y sus biotipos (Mayer-Scholl <i>et al.</i> , 2010)
Multiplex - Random amplifies polymorphic DNA PCR	Secuencias que incluyen elementos repetitivos (<i>IS711</i>), inserciones y deleciones	Distintos fragmentos, cuyas combinaciones distinguen entre especies y biotipos.	<i>B. neotomae</i> , <i>B. pinnipedialis</i> , <i>B. ceti</i> y <i>B. microti</i> . Distingue <i>B. abortus</i> biovares 1, 2 y 4 de los biovares 3, 5, 6 y 9. Diferencia entre los biovares 1, 3 y 4, 2 y 5 de <i>B. suis</i> . (Huber <i>et al.</i> , 2009)

3.5. Composición de los reactivos utilizados en la clonación

a) Medio Luria-Bertani (LB) líquido, 1 litro:

- 5 g extracto de levadura;
- 10 g tryptona o peptone;
- 10 g NaCl.

b) Medio Luria-Bertani (LB) sólido, 1 litro:

- 5 g extracto de levadura;
- 10 g triptona;
- 10 g NaCl;
- 15 g agar.