



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE UNA REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA CONVENCIONAL, PARA EL DIAGNÓSTICO DE
Brucella canis EN CULTIVO PURO Y MUESTRAS DE SANGRE Y
ORINA**

Ignacio Andrés Silva Urzúa

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE UNA REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA CONVENCIONAL, PARA EL DIAGNÓSTICO DE
Brucella canis EN CULTIVO PURO Y MUESTRAS DE SANGRE Y
ORINA**

Ignacio Andrés Silva Urzúa

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESORA GUÍA	: CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CORRECTOR	: CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CORRECTOR	: PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO, CHILE
2016

RESUMEN

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica causada por *Brucella canis*, la cual produce signos reproductivos como abortos en hembras e infertilidad en machos, siendo transmitida al hombre a través de contacto con perras que hayan parido o abortado recientemente o por exposición a la bacteria en laboratorios. La enfermedad actualmente presenta tres puntos críticos y que afectan directamente su control y prevención: i) no existen vacunas comerciales, ii) no hay tratamientos antimicrobianos exitosos y iii) existen problemas en el diagnóstico por cultivo tradicional debido a su lento crecimiento e intermitencia en la bacteremia, y problemas en la sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas en el diagnóstico indirecto. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) surge entonces como una opción de diagnóstico por ser altamente sensible y específica, otorgando además una pesquisa rápida. En el presente estudio se estableció la sensibilidad analítica de un protocolo de PCR convencional con partidores diseñados en el país en cultivo puro, muestras de sangre y orina para el diagnóstico de *B. canis*. La sensibilidad analítica en cultivo puro fue de 22,24 fg/ μ L de DNA y en muestras de sangre y orina experimentalmente contaminadas de $4,4 \times 10^0$ UFC/mL. La elevada sensibilidad analítica determinada sugiere que este protocolo puede ser utilizado como una alternativa de alto valor para el diagnóstico de *B. canis* en las muestras mencionadas, siendo importante continuar con esta línea de investigación, orientando estos hacia un estudio más detallado de especificidad y estudios de sensibilidad analítica en otras matrices.

Palabras clave: Brucelosis canina, *Brucella canis*, PCR, sangre, orina, sensibilidad analítica.

ABSTRACT

Canine brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella canis*, which produces reproductive signs such as abortion in bitches and infertility in dogs. These being transmitted to humans by contact with bitches that have recently given birth or aborted or by exposure to the bacteria in laboratories. Currently, the disease has three critical points that, to date, have not been resolved and that directly affect the control and prevention of this: i) there are no commercial vaccines, ii) no successful antimicrobial treatments and iii) problems in diagnosis; existing both difficulties to isolate the agent because of its slow growth and intermittent bacteremia in bacterial culture, and sensitivity and specificity problems in the numerous serological techniques. The PCR, thus, emerges as a diagnostic option due to its highly sensitive and specific nature, providing a fast diagnosis as a result. In the present study, the analytical sensitivity of conventional PCR protocol with primers designed in the country in pure culture, blood and urine samples for diagnosis of *B. canis* was established. The analytical sensitivity in pure culture was 22,24 fg/ μ L of DNA, and in experimentally contaminated blood and urine samples $4,4 \times 10^0$ UFC/mL. Given the high analytical sensitivity suggests that this protocol can be used as a highly valuable alternative for the diagnosis of this disease in the samples mentioned, understanding - consequently -, the major importance to continue this line of research, orienting these to a more detailed study of specificity, and analytical sensitivity studies in other matrices.

Keywords: Canine brucellosis, *Brucella canis*, PCR, blood, urine, pure culture, analytical sensitivity.

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis canina es una enfermedad zoonótica causada específicamente por *Brucella canis*, la cual, al igual que todas las bacterias del género, es un cocobacilo Gram negativo intracelular facultativo (Greene y Carmichael, 2012). Esta bacteria está presente en casi todo el mundo, a excepción de Nueva Zelanda y Australia, donde no hay casos informados. Su transmisión suele ser venérea, siendo también importante la transmisión por contacto con restos placentarios o fetos abortados (CFSPH, 2012). El patógeno puede ingresar vía oronasal, genital y conjuntival, desde donde es fagocitado por macrófagos y otras células fagocíticas, y transportado a órganos linfoides, existiendo en ellos replicación bacteriana. La bacteria llega a circulación sanguínea entre los 7 a 30 días post-exposición, desde donde se disemina a los tejidos dependientes de esteroides (epidídimo, próstata, útero, placenta), produciéndose signología asociada a la infección. En machos, el signo principal en la etapa aguda de la infección es la epididimitis, seguido de atrofia testicular y del epidídimo en casos crónicos. La prostatitis también es un signo común. Debido al daño testicular se inducen anticuerpos antiespermatozoides, produciéndose oligozoospermia o azoospermia (Makloski, 2011). En hembras, el signo principal es aborto en etapas tardías de la gestación (día 45-59), siendo menos común la reabsorción embrionaria (CFSPH, 2012). Los cachorros nacidos muertos o abortados pueden presentar signos típicos de autólisis, y si nacen vivos, es común que mueran dentro de las primeras horas, o puedan sobrevivir y desarrollar la enfermedad en la pubertad. Luego del aborto o parición, la hembra presenta descargas vaginales con elevada concentración de bacterias por varias semanas (Greene y Carmichael, 2012).

En el caso de brucelosis humana causada por *B. canis*, la transmisión ocurre habitualmente por contacto con productos placentarios de abortos o partos de perras, o por exposición a grandes concentraciones del organismo en laboratorios (CFSPH, 2012). Si bien no se presentan casos frecuentes de esta enfermedad, se cree que su diagnóstico está subestimado (Lucero *et al.*, 2005). En Chile, Hormazábal *et al.*, (2014), a través de la sección de bacteriología del Instituto de Salud Pública de Chile, identificaron 3 casos de brucelosis humana por *B. canis* entre el 2009 y el 2014.

Este agente también ha sido aislado en perros en nuestro país, siendo encontrado por primera vez en 1978 simultáneamente en la Región Metropolitana y en Valdivia (Pinochet

et al., 1979; Zamora *et al.*, 1980). En 1979, se determinó un 11,5% de seropositividad de un total de 226 reproductores provenientes de 13 criaderos de la Región Metropolitana, mediante inmunodifusión en gel de agar (AGID) (Pinochet *et al.*, 1979). Posteriormente, en 1986 se detectó un aumento de la seropositividad a un 13,5% por AGID en 446 perros de 9 criaderos de la Región Metropolitana, donde dos de ellos alcanzaron una positividad cercana a un 40% en sus animales (Sánchez *et al.*, 1986). Gómez, el 2007, estableció la seroprevalencia de un 16,8%, mediante contraelectroforesis (CIEF), en los 363 perros analizados en clínicas veterinarias de las 34 comunas de Santiago. Por último, el año 2013, a través de CIEF, se determinó que 6 de 33 animales (18,18%) fueron seropositivos a *B. canis*, en 3 criaderos de la comuna de Curicó (Troncoso *et al.*, 2013). La situación en otros países de Latinoamérica no es muy distinta de la nacional, como lo demuestran los trabajos de Boeri *et al.*, (2008) en Argentina, donde se ha observado una seroprevalencia de un 7,3% en animales de diversos barrios de la ciudad de Buenos Aires. En Colombia, mediante la técnica de 2ME-RSAT, se ha establecido una seropositividad de un 12,4% en 499 perros de 21 criaderos de la región de Antioquia (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2014). Además, se ha observado un 6,14% de positividad mediante 2ME-RSAT en 221 perros callejeros de la ciudad de Medellín (Ruíz *et al.*, 2010). En Brasil, el 2004 mediante la técnica de AGID, se ha establecido una seropositividad de un 33,91% de un total de 171 perros provenientes de 12 criaderos del estado de Sao Paulo (Keid *et al.*, 2004). Es importante considerar que, si bien los valores obtenidos por estos estudios no siempre son comparables dado que utilizan técnicas con diferentes valores de sensibilidad y especificidad, y además la mayoría no son prevalenciales, se enfrenta una situación en América Latina que está lejos de ser controlada. Las altas prevalencias se explican, entre otros, por la ausencia de tratamientos antimicrobianos con éxito terapéutico, no existen vacunas comerciales aplicables y a la fecha no hay una estandarización en los métodos de diagnóstico (Borie, 2014). Este último punto es crítico, ya que dificulta la detección de animales enfermos y con ello las posibilidades reales de control.

Al respecto, cabe destacar que el único examen confirmatorio hasta la fecha es el aislamiento bacteriano, cuya principal ventaja es la temprana detección del patógeno, desde las 2 a las 4 semanas post infección (PI) (Greene y Carmichael, 2012). Sin embargo, presenta desventajas al ser una bacteria de crecimiento lento, desde los 7 días e incluso 21

días en el caso particular del hemocultivo (Borie y Galarce, 2015). Además, cuando la bacteria se aísla de muestras contaminadas es necesario el uso de medios selectivos, como el agar *Brucella* y agar Thayer-Martin modificado asociados a antibióticos (Borie y Galarce, 2015), lo cual puede inhibir más aún el crecimiento de *B. canis*. En el caso del hemocultivo, la interpretación debe ser cautelosa ya que la bacteremia es intermitente, por lo cual un resultado negativo no descarta la presencia de infección. Por último, al ser un patógeno zoonótico debe ser manejado por personal capacitado y con niveles de contención biológica tipo 2 para manejo de muestras y tipo 3 para manejo de cultivos (Percin, 2013).

La alternativa al diagnóstico directo tradicional es el diagnóstico indirecto mediante pruebas serológicas. Dentro de ellas se encuentran la aglutinación rápida en placa (RSAT) con o sin 2-mercaptoetanol (2ME), aglutinación en tubo (TAT) con o sin 2ME, inmunodifusión en gel de agar (AGID), contrainmunolectroforésis (CIEF), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunocromatografía (IC) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los exámenes de aglutinación son usualmente utilizados como *screening*, y tienen como desventaja un alto porcentaje de falsos positivos (CFSPH, 2012). Las distintas técnicas serológicas presentan variaciones en su sensibilidad y especificidad (Tabla 1), razón por la cual se considera necesario el uso del diagnóstico directo para confirmar la presencia de la bacteria (Keid *et al.*, 2009). Otra desventaja es que la seroconversión se puede aplazar hasta incluso después de la 8-12 semana post infección (PI) (Makloski, 2011), siendo el tipo de antígeno utilizado para la reacción de relevancia en el tiempo de detección. Al respecto, en el caso del 2ME-RSAT se puede lograr positividad a partir de las 3-4 semanas PI cuando se utilizan antígenos provenientes de la pared bacteriana (principalmente LPS), llegando a las 8-12 semanas PI para la técnica de CIEF, cuando se utilizan antígenos de proteínas citosólicas (Greene y Carmichael, 2012). En Chile, para el diagnóstico serológico actualmente se ofrecen las técnicas de IC, IELISA, IFI y CIEF (Borie, 2014).

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de distintas técnicas serológicas para el diagnóstico de *B. canis*

<i>Técnica</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Gold Standard</i>	<i>Referencia</i>
<i>RSAT</i>	75,0 %	90,3%	Hemocultivo / PCR Sangre	Keid <i>et al.</i> , 2015
<i>2ME-RSAT</i>	37,5%	100%	Hemocultivo / PCR Sangre	Keid <i>et al.</i> , 2015
<i>AGID</i>	27,98%	96,7%	Hemocultivo / PCR Sangre	Keid <i>et al.</i> , 2015
<i>IC</i>	89,58%	93,5%	Hemocultivo / PCR Sangre	Keid <i>et al.</i> , 2015
<i>ELISA</i>	91,8%	100%	Hemocultivo / PCR Sangre	De Oliveira <i>et al.</i> , 2011

Considerando los inconvenientes mencionados en el cultivo tradicional y en las técnicas serológicas, se ha desarrollado una técnica de detección genómica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de este patógeno, debido fundamentalmente a su sensibilidad, especificidad y rapidez en la detección. Sin embargo, la alta similitud genómica del género es uno de los principales problemas para la diferenciación entre especies del género *Brucella*, ya que existe una identidad nucleotídica superior al 94%, con una relación aún más estrecha entre las especies *B. canis* y *B. suis* (Olsen y Palmer, 2014). En la búsqueda de un protocolo de PCR específico de *B. canis*, Hinić *et al.*, (2008) utilizaron una delección específica en el cromosoma II de la cepa de referencia de *B. canis* RM6/66 como sitio de amplificación de los partidores, observando el mismo patrón en *B. canis* y *B. suis* biovar 4. Ese mismo año, López-Goñi *et al.*, (2008) utilizaron un par de partidores que amplifican un fragmento de 749 pares de bases (pb) presente en *B. suis* y ausente en *B. canis*, debido a una delección de 976 pb en el cromosoma I de esta última. Pese a lo anterior, 9 de las 21 cepas estudiadas de *B. canis* presentaron el fragmento. Este problema se corrigió en una nueva PCR múltiple, denominada *Suis-ladder* (López-Goñi *et al.*, 2011), que diferenció satisfactoriamente los 5 biovares de *B. suis* de *B. canis* mediante un par de partidores que amplificaron un segmento de 774 pb sólo presente en *B. suis*. Kang *et al.*, (2011) describieron una PCR múltiple capaz de diferenciar *B. suis* de *B. canis*,

basándose en una deleción de 12 pb presente sólo en esta última. El segmento de 766 pb logró discriminar correctamente las cepas de *B. suis* frente a las de *B. canis* por la ausencia del amplicón en esta última. Tres años después, Kang *et al.*, (2014) desarrollaron una PCR especie-específica para *B. canis* (denominada BcSS-PCR), utilizando como sitio para el diseño de partidores una secuencia de 12 pb sólo presente en *B. canis*, y cuyo blanco de amplificación es un segmento intergénico de tamaño conservado dentro de la especie. Los resultados denotaron una amplificación específica, observándose un amplicón de 300 pb en 94 cepas de campo y en la cepa RM6/66 de *B. canis*, sin observarse amplificación en las cepas de referencia de las otras especies del género (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. ceti*, *C. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*), ni en bacterias de otros géneros (*Ochrobactrum anthropi*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella Typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*). Simultáneamente, Kauffmann *et al.*, (2014) desarrollaron una PCR cuantitativa (qPCR) para la detección de *B. canis* en sangre entera, torulados vaginales, orina, hígado y tejido del tracto genitourinario, utilizando el gen *omp25* (proteína de membrana externa) para la detección. Observaron una sensibilidad de un 92,31% y especificidad de un 51,92% en muestras de fluidos vaginales, utilizando como *gold standard* los animales positivos y negativos a dos técnicas serológicas (AGID y 2-ME RSAT). Adicionalmente, observaron que un 20% de los animales, inicialmente seronegativos mediante serología y positivos por qPCR, resultaron positivos al aplicarse el test serológico un mes después.

A nivel nacional, Lorca *et al.*, (2013) implementaron un protocolo de PCR utilizando como enfoque la búsqueda de una zona poco conservada en el genoma de *B. canis* respecto de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*. Los autores diseñaron partidores *in silico*, utilizando como blanco de amplificación un segmento intergénico del cromosoma I de *B. canis*, logrando identificar un amplicón de alrededor de 430 pb observable sólo en la cepa de *B. canis* utilizada para este estudio (Número de acceso: NZ_LGAQ00000000.1) (FAVET-INBIOGEN). Además, observaron amplicones de 366 pb para *B. suis* bv.1 cepa 1330 (Número de acceso: NC_017251) y de 334 pb para *B. abortus* cepa RB51 (Número de acceso: NZ_AQIE01000001) y cepa C19 (Número de acceso: NC_010742.1). No se detectó amplificación en *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Si bien se ha logrado establecer protocolos para la detección específica de *B. canis* (Kang *et al.*, 2014; Kauffmann *et al.*, 2014) en cultivos puros y en distintas matrices, las sensibilidades analíticas han sido diferentes. Se reconoce que uno de los factores que afecta directamente la sensibilidad de la PCR es la presencia de inhibidores propios de la muestra, tales como iones, moléculas o proteínas, que producen la inhibición mediante la unión de éste a la polimerasa, degradación de la polimerasa, o unión al DNA (Wilson, 1997; Opel *et al.*, 2010). Teniendo esto en cuenta, se hace imperativo conocer el efecto de los inhibidores en el rendimiento de una PCR. Lo anterior se puede establecer mediante el estudio de la sensibilidad analítica, parámetro utilizado como un criterio para la validación de una prueba, el cual permite establecer el límite de detección inferior (LDI) de una técnica diagnóstica, siendo este la cantidad mínima de analito (en este caso bacterias) en una matriz determinada que produciría un resultado positivo (OIE, 2014).

En este contexto, Keid *et al.*, (2007a) han establecido una concentración de $1,0 \times 10^0$ UFC/mL como LDI en la PCR en sangre entera utilizando los partidores ITS66 y ITS279, específicos para *Brucella spp.*, que tienen como blanco de amplificación la región entre el rDNA 16S-23S. Es importante destacar que la alta sensibilidad se logró mediante 5 lavados de la muestra con Buffer Tris EDTA, hasta lograr la eliminación de la hemoglobina (ausencia de color rojo en el sedimento) la cual, se presume, inhibe la reacción por unión a la polimerasa (Al-Soud y Rådström, 2001; Schrader *et al.*, 2012). Adicionalmente, el 2010 los mismos autores realizaron una comparación entre el LDI en sangre y en suero, obteniendo LDI tan bajos como $1,0 \times 10^0$ UFC/mL en ambos casos, utilizando los mismos partidores y el mismo protocolo de lavado en sangre. Menores sensibilidades obtuvieron Kang *et al.*, (2014) logrando un LDI en sangre de 3×10^5 UFC/mL y de 3×10^3 UFC/mL en costra flogística utilizando un par de partidores específicos para *B. canis* (BcSS-PCR). En este estudio no se realizó eliminación de hemoglobina por lavados, pero se utilizó un kit comercial para extracción de DNA en sangre y tejidos. De igual modo, Kauffmann *et al.*, (2014) establecieron un LDI en muestras de sangre de 19 equivalentes genómicos de *B. canis* por mL de muestra, utilizando como blanco de amplificación de los partidores el gen *omp25*. Al igual que el autor anterior, sólo utilizaron un kit comercial para extracción de DNA y no lavados de sangre para eliminar la hemoglobina. A nivel nacional, Aránguiz (2011) estableció un LDI en muestras de sangre contaminadas experimentalmente con *B.*

canis de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, utilizando los partidores 26 A1 y 26 B, cuyo sitio blanco a amplificar es el gen bp26 que codifica una proteína inmunodominante en infecciones causadas por *Brucella* spp. En este caso, se efectuó el protocolo de lavado de Keid *et al.*, (2007a) sólo ante la ineficacia de uno de los kits utilizados para la extracción de DNA y posterior amplificación y visualización.

Por otra parte, sobre la sensibilidad analítica en orina, es posible encontrar falsos negativos debido a altas concentraciones de urea en la muestra, por lo cual se requieren diluciones y/o protocolos que eliminen la actividad de esta molécula como denaturador de la polimerasa *Taq* (Wilson, 1997). Es así como Queipo-Ortuño *et al.*, (2006) han establecido un LDI de 2×10^0 UFC/mL en muestras de orina de personas infectadas naturalmente con *B. melitensis*, mediante un protocolo de purificación de DNA que incluía tres centrifugaciones, dos lavados del pellet y ebullición de la muestra. Hasta la fecha, no existen publicaciones sobre sensibilidad en orina de perro contaminada con *B. canis*. Kauffmann *et al.*, (2014) realizaron una qPCR en la cual, si bien se estableció un LDI en muestras de sangre, no se realizó esta medición en muestras de orina. Sin embargo, cabe destacar que, de 6 muestras de orina analizadas, todas de animales sin signología clínica provenientes de criaderos donde se habían documentado casos de brucelosis, 4 de estas fueron positivas a este ensayo.

Otras matrices utilizadas han sido muestras de fluidos vaginales y de semen, determinándose para éstas sensibilidades analíticas similares ($1,0 \times 10^0$ UFC/mL), utilizando los partidores ITS66 y ITS279 (Keid *et al.*, 2007b; Keid *et al.*, 2007c). Asimismo, Kim *et al.*, (2006) realizaron un ensayo de PCR anidado para la detección de *B. canis* en muestras de semen, alcanzando en *B. canis* un LDI mayor a los estudios previamente mencionados ($4,0 \times 10^3$ UFC/mL), utilizando un par de partidores que amplifican el gen *virB2* de *Brucella* spp.

Considerando los resultados obtenidos por Lorca *et al.*, en el 2013, y teniendo en cuenta que para la aplicación de cualquier protocolo de PCR es necesario un estudio de sensibilidad analítica en muestras de interés clínico, es que se realizará una PCR convencional en cultivo puro y muestras de sangre entera y orina, para establecer los LDI y con ello la sensibilidad analítica de este método en el diagnóstico de *B. canis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (LB-FAVET). La visualización de los amplicones se realizó en el Laboratorio de Virología de FAVET.

1. Cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *B. canis* aislada desde un perro adulto por el LB-FAVET. Esta cepa se encuentra secuenciada (Número de acceso: NZ_LGAQ00000000.1) (FAVET-INBIOGEN) y presenta una alta identidad nucleotídica (sobre el 95%) con la cepa de referencia *B. canis* RM6/66, según el análisis filogenético realizado por alineamiento de secuencias del gen 16S RNAr (FAVET-INBIOGEN). La cepa fue utilizada como control positivo en la PCR y en la contaminación experimental de las muestras de sangre y orina.

2. Protocolo de PCR

El protocolo de PCR utilizado fue el descrito por Lorca *et al.*, (2013)

2.1. Partidores y amplificación:

Las secuencias nucleotídicas de los partidores son: BC1: 5'-ACGAACACAAGGGCC AATAC-3' y BC2: 5'- GGACGGCTACAAGATCGAAG-3'. Así, se mezclaron 15 µL de 2X PCR Mastermix (Fermentas®), 5 µL de cada partidor (1 µM) y 5 µL del DNA extraído (ver punto 3.2 y 4.3). Luego, se realizó la amplificación que consistió en una denaturación inicial a 94° C durante 1 min, 35 ciclos que constan de una denaturación a 94° C por 1 min, alineamiento a 55° C por 1 min y elongación a 72° C por 1 min. Por último, una elongación final a 72° C por 5 min. Como controles negativos se utilizó DNA purificado de *Escherichia coli* ATCC 25922 y de *B. suis* bv.1 cepa 1330 (Número de acceso: NC_017251) donado por el Dr. Silvio Cravero (Inta, Argentina). Como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas, y como control positivo la cepa de *B. canis* descrita en el punto 1.

2.2. Visualización:

El producto amplificado se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en buffer Tris Acetato EDTA (TAE) (Fermentas®). Se mezclaron 5 µL del producto con 1 µL de 6X Mass Ruler Loading Dye Solution (Fermentas®). Se usó un marcador de tamaño molecular de 100-1500 pb (AccuRuler 100 bp DNA Ladder, Maestrogen®). Una vez cargado el gel, la electroforesis se realizó a 90 V por 40 min. Luego, se incubaron los geles en Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) (Fermentas®) durante 40 min, para finalmente observar y fotografiar un amplicón menor a 500 pb en un transiluminador de luz UV (Transiluminator UVP®).

3. **Sensibilidad analítica en cultivo puro**

3.1. Preparación del inóculo:

Se preparó una suspensión bacteriana *stock* suspendiendo varias colonias de *B. canis*, cultivadas en agar Tripticasa de Soya (Difco®) por 48 h a 37° C° y se ajustó la turbidez de este tubo *stock* con agua destilada estéril al patrón 0,5 del nefelómetro de McFarland (concentración teórica de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para corroborar su concentración, se realizó un recuento de UFC en agar Tripticasa de Soya (Difco®), considerando diluciones al décimo. Los tubos *stock* y de las diluciones al décimo (10^7 a 10^0)- fueron congelados para su posterior uso en la contaminación experimental de sangre y orina.

3.2. Extracción de DNA de cultivo puro

Previo a este procedimiento, una alícuota de la suspensión *stock* (10^8) fue sometida a ebullición a 100°C por 15 minutos, como acción bactericida. La extracción y purificación de DNA de esta alícuota se realizó mediante el kit “FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction” (FAVORGEN®), según las instrucciones del fabricante. El producto purificado fue sometido a espectrofotometría a 260 y 280 nm en la unidad de investigaciones FAVET INBIOGEN mediante el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek®), con el objeto de corroborar la concentración de DNA obtenida de la extracción. Luego de esta medición se realizaron diluciones del producto purificado, que permitieron establecer distintas concentraciones bacterianas teóricas (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 bacterias/µL) con las cuales se estableció el LDI en cultivo puro.

3.3. Amplificación y visualización:

Se realizó la amplificación (en triplicado) y visualización del fragmento siguiendo el protocolo descrito en el punto 2. Se estableció como LDI del ensayo en cultivo puro la menor concentración de DNA en que se logró la visualización de una banda.

4. **Sensibilidad analítica en muestras experimentalmente contaminadas**

4.1. Obtención de muestras de perros negativos a *Brucella canis*:

Los animales seleccionados como donantes de sangre y/u orina fueron aquellos en los cuales no existió historial médico asociado a signología clínica de infección por *B. canis* y seronegativos por CIEF, cuyos cultivos (orina y/o sangre) fueran negativos a *B. canis*. Para el hemocultivo (Anexo 1), se obtuvo 3,5 mL de sangre con citrato de sodio como anticoagulante. Un mL de sangre adicional se utilizó para la CIEF, que se realizó según los protocolos establecidos por LB-FAVET (Anexo). Las muestras de orina fueron obtenidas por cistocentesis, las cuales fueron donadas por el Profesor Gustavo Farías. Estas muestras se sometieron a cultivo de acuerdo a los protocolos propios de LB-FAVET. Se obtuvieron 20 mL de sangre y orina, y se conservaron a -20° C hasta su contaminación experimental.

4.2. Contaminación experimental de muestras de sangre y orina:

Previo a la contaminación, 1 mL de cada concentración bacteriana descrita en el punto 3.1 fue sometida a ebullición a 100° C por 15 minutos, como acción bactericida. Se contaminaron muestras de sangre y orina para obtener las siguientes concentraciones bacterianas: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 UFC/mL.

4.3. Extracción de DNA de muestras contaminadas:

Se realizó la extracción en triplicado para cada concentración en las muestras de sangre y orina. Los protocolos de extracción variaron según el tipo de matriz:

Sangre: Para la eliminación de la potencial actividad inhibitoria de la hemoglobina sobre la polimerasa *Taq*, se centrifugó 1 mL de la muestra a 13.000g por 5 min. El pellet fue resuspendido en 1 mL de buffer TAE, mezclado y centrifugado nuevamente a 13.000g por 5 min. Este proceso se realizó cinco veces más (Keid *et al.*, 2007a). Finalmente se procedió

a la extracción de DNA con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®). La extracción se realizó según las indicaciones del fabricante.

Orina: Se utilizó el protocolo descrito por Queipo-Ortuño *et al.*, (2006), con el objetivo de eliminar la actividad inhibitoria de la urea sobre la polimerasa *Taq*. Para ello, se centrifugaron 2 mL de orina por 15 min a 15.000g. Se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 200 µL de agua estéril, para centrifugar por 10 min a 15.000g. Nuevamente se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el sedimento en 60 µL de agua estéril, para someterlo a ebullición en baño termorregulado por 10 min. Luego, se enfrió la muestra en hielo, y se centrifugó por 10 s a 15.000g, para remover cualquier gota de la parte superior del borde. Esta suspensión fue sometida a extracción de DNA con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4. Amplificación y visualización:

Se realizó la amplificación y visualización del fragmento siguiendo el protocolo descrito en el punto 2. Se estableció como LDI del ensayo la menor concentración de bacterias (UFC/mL) que logró la visualización de una banda, en muestras de sangre y de orina.

5. Medidas de Bioseguridad

Se establecieron rigurosas medidas de bioseguridad para evitar el riesgo de infección del personal y del ambiente por mal manejo del patógeno (CONICYT, 2008). Se contó con un certificado de bioseguridad otorgado por el Comité de Bioseguridad de FAVET para este estudio. Entre las medidas adoptadas están: capacitación en buenas prácticas de laboratorio, restricciones de ingreso de personal, uso de gabinete de bioseguridad clase 2, delantal, guantes, mangas, mascarilla, desinfectantes y manejo de material contaminado en receptáculos cerrados. Para la visualización del producto de electroforesis se utilizó guantes de látex desechables, ya que el Bromuro de Etidio posee propiedades mutagénicas. Al utilizar el transiluminador se ocuparon gafas con filtro UV. Finalmente, el gel se incineró en FAVET junto con los guantes utilizados en el proceso.

RESULTADOS

Al realizar el recuento de UFC de la suspensión bacteriana *stock*, se estableció una concentración inicial de $4,4 \times 10^8$ UFC/mL, por lo tanto, la contaminación experimental se realizó con las concentraciones comprendidas entre $4,4 \times 10^5$ UFC/mL y $4,4 \times 10^1$ UFC/mL.

Se determinó una concentración de DNA del Stock de 2,224 ng/ μ L, lo que corresponde a 5,05 fg de DNA por bacteria. Al realizar las diluciones de esta concentración inicial de DNA, se obtuvieron las concentraciones teóricas de 222,4 pg/ μ L, 22,24 pg/ μ L, 2,224 pg/ μ L, 222,4 fg/ μ L y 22,24 fg/ μ L, que corresponden, respectivamente, a $4,4 \times 10^4$, $4,4 \times 10^3$, $4,4 \times 10^2$, $4,4 \times 10^1$ y $4,4 \times 10^0$ bacterias/ μ L. (Queipo-Ortuño *et al.*, 2006; Baily *et al.*, 1992).

1. Sensibilidad analítica en cultivo puro

Como se puede observar en la Figura 1, el LDI del ensayo en cultivo puro correspondió a 22,24 fg/ μ L, lo que representa una concentración teórica de $4,4 \times 10^0$ bacterias/ μ L.

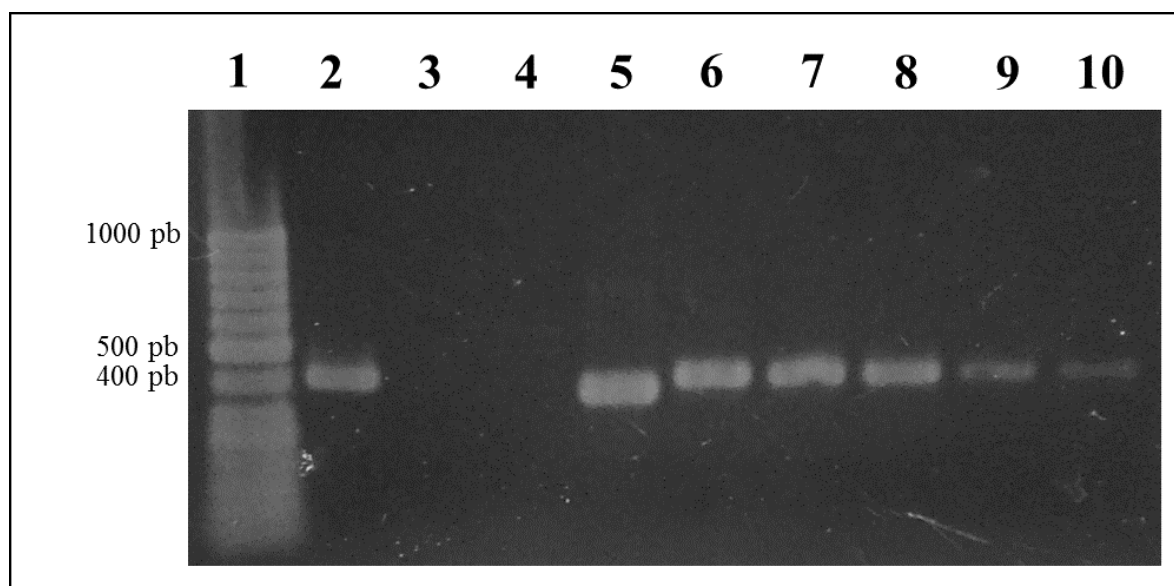


Figura 1. Límite de detección inferior del ensayo en cultivo puro utilizando diluciones al décimo de DNA de *B. canis*. Carril 1: Marcador de Tamaño Molecular (100-1000 pb). Carril 2: *B. canis* con un amplicón <500 pb. Carril 3: Agua Libre de Nucleasas. Carril 4: *E. coli*. Carril 5: *B. suis* con un amplicón de <400 pb. Carril 6: 222,4 pg/ μ L. Carril 7: 22,24 pg/ μ L. Carril 8: 2,224 pg/ μ L. Carril 9: 222,4 fg/ μ L. Carril 10: 22,24 fg/ μ L.

2.- Sensibilidad analítica en muestras de sangre y orina experimentalmente contaminadas.

El LDI del ensayo en muestras de sangre contaminadas experimentalmente correspondió a $4,4 \times 10^0$ UFC/mL (Figura 2).

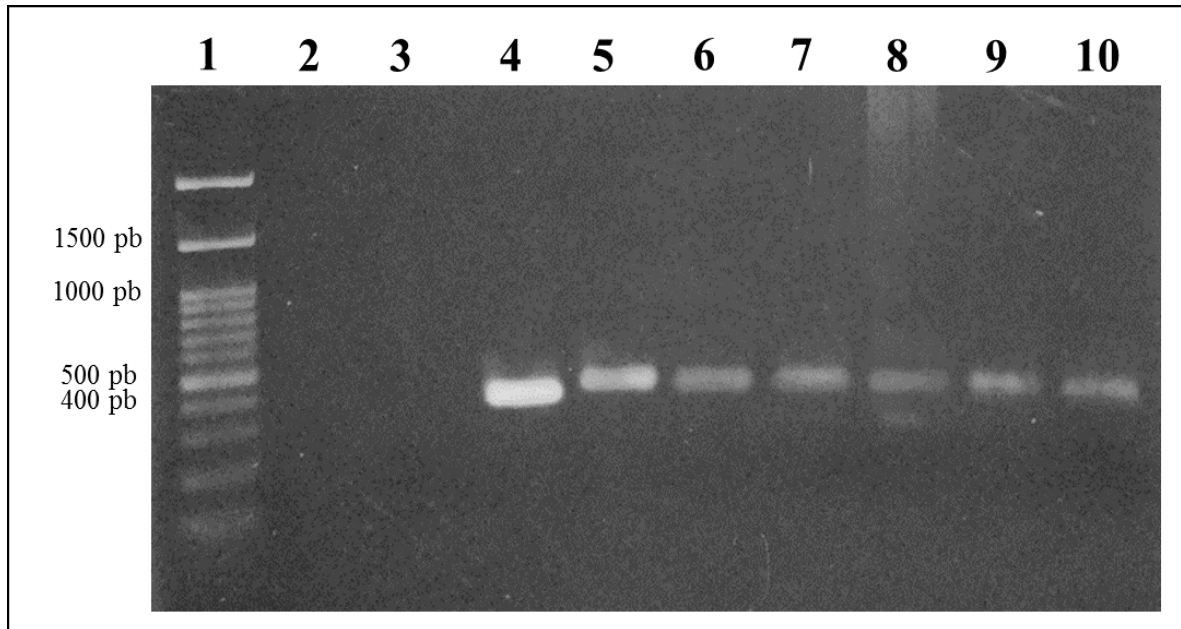


Figura 2. Límite de detección inferior del ensayo en muestras de sangre contaminadas experimentalmente con concentraciones decrecientes de *B. canis*. Carril 1: Marcador de Tamaño Molecular (100-1500 pb). Carril 2: Agua Libre de Nucleasas. Carril 3: *E. coli*. Carril 4: *B. suis* con un amplicón <400 pb. Carril 5: *B. canis* con un amplicón <500 pb. Carril 6: Sangre con $4,4 \times 10^4$ UFC/mL. Carril 7: Sangre con $4,4 \times 10^3$ UFC/mL. Carril 8: Sangre con $4,4 \times 10^2$ UFC/mL. Carril 9: Sangre con $4,4 \times 10^1$ UFC/mL. Carril 10: Sangre con $4,4 \times 10^0$ UFC/mL.

El resultado del LDI en muestras de orina experimentalmente contaminadas (Figura 3), muestra que el LDI correspondió a $4,4 \times 10^0$ UFC/mL.

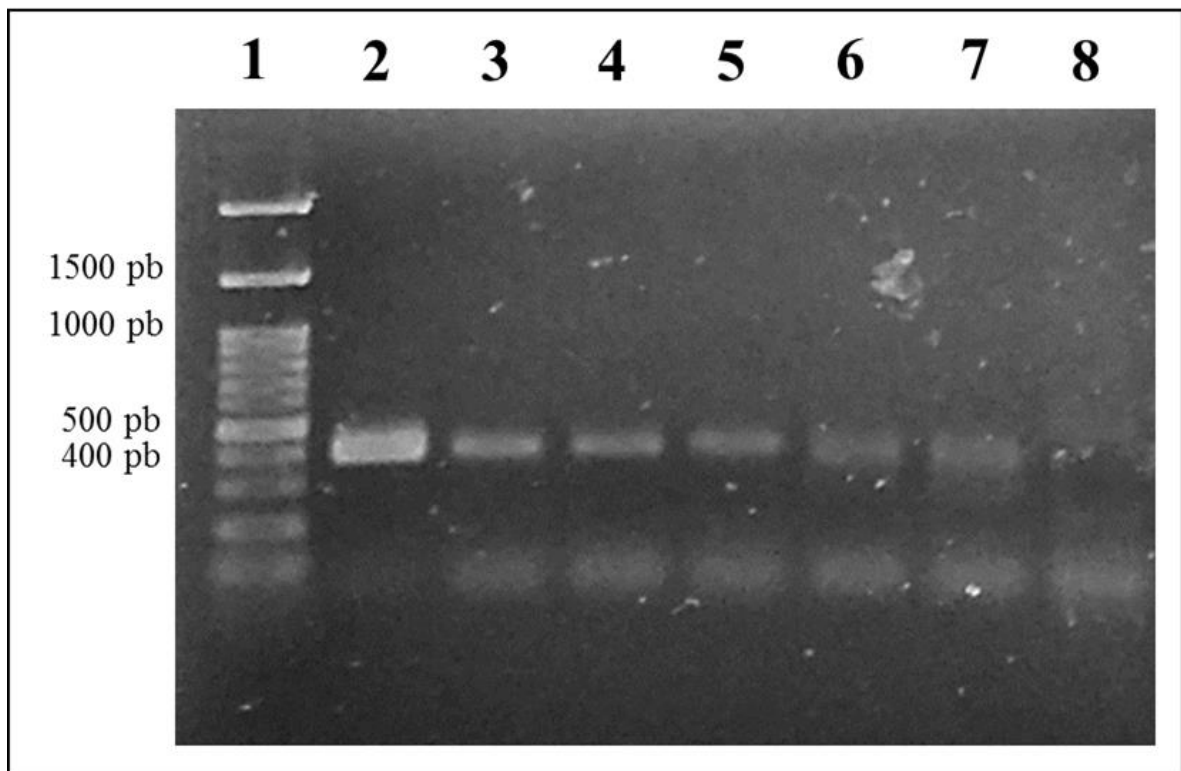


Figura 3. Límite de detección inferior del ensayo en muestras de orina contaminadas experimentalmente con concentraciones decrecientes de *B. canis*. Carril 1: Marcador de Tamaño Molecular (100-1500 pb). Carril 2: *B. canis* con un amplicón <500 pb. Carril 3: Orina con $4,4 \times 10^4$ UFC/mL. Carril 4: Orina con $4,4 \times 10^3$ UFC/mL. Carril 5: Orina con $4,4 \times 10^2$ UFC/mL. Carril 6: Orina con $4,4 \times 10^1$ UFC/mL. Carril 7: Orina con $4,4 \times 10^0$ UFC/mL. Carril 8: *E. coli*.

DISCUSIÓN

Son muchas las aristas que aún no han sido resueltas en relación a la brucelosis canina producida por *B. canis*. Entre ellas, destacan las dificultades que se presentan en el diagnóstico de este patógeno. Es a raíz de estas dificultades, que la PCR se presenta como una alternativa que cumple con las características deseadas, al ser rápida, sensible y específica.

En el presente estudio se logró establecer una alta sensibilidad (22,24 fg/ μ L de DNA bacteriano, correspondiente a $4,4 \times 10^0$ bacterias/ μ L) en cultivos puros. Este resultado se encuentra dentro de los valores esperados, puesto que en estudios tanto nacionales como internacionales se observan valores entre los 3,8 fg/ μ L (Keid *et al.*, 2007a) y 105 fg/ μ L de DNA bacteriano (Aránguiz, 2011), con la excepción del estudio de Kang *et al.*, (2014), cuyos valores son demasiado elevados (6000 fg/ μ L de DNA de *B. canis*) y donde, si bien se observa una diferencia en el LDI en cultivo puro respecto de otros estudios, los autores no analizaron el resultado desde ese enfoque.

En cuanto a la sensibilidad analítica en muestras de sangre, si bien resultó ser una muestra más difícil de manejar (en relación al cultivo puro y a la orina), se observó un LDI de $4,4 \times 10^0$ UFC/mL, resultado que se encuentra también dentro de lo esperado respecto de los valores obtenidos en otros estudios, como el de Keid *et al.*, (2007a) obtuvieron un LDI en sangre de $1,0 \times 10^0$ UFC/mL. Esto era esperable ya que el protocolo de extracción consideró el lavado del pellet, con la consiguiente eliminación de la hemoglobina previa extracción del DNA (ausencia del color rojo). Kang *et al.*, (2014) establecieron un LDI en sangre de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, lo que podría ser explicado ya que en el protocolo de extracción no se realizaron lavados del pellet que eliminen la hemoglobina. Finalmente, Aránguiz el 2011 estableció un LDI en muestras de sangre experimentalmente contaminadas de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL con un kit comercial específico mientras que, con un kit de otra marca, no fue capaz de detectar la bacteria en ninguna concentración analizada. El autor atribuye estas diferencias a las bondades que ofrece la marca de cada kit. Incluso, cabe destacar que, aun cuando se procedió al lavado del pellet de la misma manera que Keid *et al.*, (2007a), el kit con resultados menos satisfactorios no logró una eficaz extracción del DNA, lo cual acentúa el importante rol que cumple éste en la obtención de buenos resultados.

La sensibilidad analítica en orina fue igual de elevada que en sangre: $4,4 \times 10^0$ UFC/mL, y mayor a la obtenida por Xavier *et al.*, (2010): $1,0 \times 10^1$ UFC/mL, en un protocolo de PCR para el diagnóstico de *B. ovis*. Si bien en el estudio no se menciona el protocolo de extracción de DNA utilizado, es factible que sea la etapa que genera diferencias con lo establecido en el presente estudio. Cabe recalcar que dentro de la literatura no existen estudios de sensibilidad analítica en muestras de orina para *B. canis*.

Es importante destacar que la selección de las muestras utilizadas en este estudio (sangre y orina) obedeció a su factibilidad de obtención a nivel clínico, tanto en fase aguda como crónica de la infección (Makloski, 2011). Si bien cuando se sospecha de esta enfermedad estas muestras deben ser manejadas con los niveles de contención biológica adecuados, este nivel es sustancialmente menor al necesario para el manejo de cultivos (CONICYT, 2008), siendo esta otra importante ventaja frente al cultivo tradicional. Lo anterior supone una ventaja desde el punto de vista práctico, ya que permite ser implementada sin modificaciones significativas en laboratorios donde se realicen ensayos de diagnóstico molecular para la detección de patógenos. Aun cuando las bondades de este PCR son destacables, se presentaron problemas en la etapa de extracción de DNA desde sangre. Debieron ser utilizados tres marcas de kits de extracción de DNA, y varias repeticiones para obtener finalmente un resultado repetible y dentro de los valores esperados. Finalmente, el kit con mejores resultados fue uno diseñado específicamente para sangre, especulando que su mayor efectividad se puede deber al método de extracción por precipitación el cual, teóricamente, permite rescatar mayor cantidad de material genético que el método por columnas. Sumado a lo anterior, existe un estudio (Kang *et al.*, 2014) donde el hemocultivo obtuvo más resultados positivos que el PCR de sangre, lo que se explica por la sensibilidad analítica propia del protocolo de PCR de cada autor. En resumen, si bien la PCR tiene ventajas prácticas, son varios los factores, no solo propios del protocolo, sino que también de cada laboratorio, que deben ser evaluados y ajustados al implementar esta técnica para el diagnóstico de *B. canis*.

Adicionalmente, presenta ventajas frente a la serología, siendo una técnica altamente sensible y específica *per se*, demostrando además este ensayo en particular la capacidad para detectar cantidades mínimas del patógeno, tanto en cultivos puros como en sangre y en

orina (Keid *et al.*, 2015). Sin embargo, cabe mencionar en el caso de la sangre que, dada la intermitencia de la bacteremia, se pueden dar situaciones donde, por ejemplo, pese a tener resultados negativos a PCR, los animales sean positivos a técnicas serológicas sin ser estos resultados falsos positivos (Kauffmann *et al.*, 2014). Por lo anterior, es importante considerar la situación clínica del animal al momento de la toma de muestra, vale decir, si existe sintomatología asociada, si la exposición fue reciente, o si se sospecha de animales crónicamente infectados. En el caso de la orina, pueden existir situaciones donde los animales sean positivos a PCR, pero negativos a otras técnicas, dado que la bacteria suele alojarse en tejidos reproductivos como testículo, epidídimo y próstata por tiempos prolongados (Keid *et al.*, 2007c).

Por último, y si bien no es parte de este estudio, es necesario recalcar lo fundamental que es el diseño de los partidores para realizar un diagnóstico diferencial, es decir, que éstos sean altamente específicos para el diagnóstico de cualquier agente. Cabe destacar que, pese a que los partidores utilizados en este estudio son específicos para este género y permiten diferenciar la cepa utilizada de *B. canis* de la cepa de *B. suis* disponible, al analizar cuán conservada es la secuencia específica mediante Primer-BLAST se observó que, aunque la mayoría de las cepas de *B. canis* ingresadas en GenBank® presentan un tamaño de amplicón cercano a las 430 pb, existen varias cepas de *B. suis* ingresadas a esta base de datos que presentaron tamaños de amplicón similar a *B. canis*, así como una cepa de *B. canis* que presentó un tamaño de amplicón muy cercano al esperado por *B. suis*. Esta situación se explica por el alto porcentaje de identidad nucleotídica del género *Brucella* y la, aún más estrecha, relación entre *B. canis* y *B. suis* (Wattam, 2009; Olsen y Palmer, 2014). Adicionalmente, existen reportes donde se manifiestan fenómenos de mutación dentro de esta especie, que son generalmente deleciones pequeñas en sitios inergénicos e intragénicos, polimorfismos y, en menor frecuencia, inserciones. Se postula que estas mutaciones están relacionadas con el tipo de hospedero y el ambiente al cual se somete el agente, lo que genera un fenómeno de adaptación por parte de la bacteria (Gao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Sanchez-Jimenez *et al.*, 2015). Estos fenómenos de mutación implican diferencias genotípicas respecto de las cepas de referencia, por lo que es esperable que el tamaño del amplicón se pudiera ver afectado.

CONCLUSIÓN

El protocolo de PCR utilizado junto con los protocolos de extracción de DNA en cultivo puro, sangre y orina, permitieron detectar la bacteria en un límite de detección dentro de lo esperado de acuerdo a valores internacionales, estableciéndose así una alta sensibilidad analítica para el diagnóstico de *B. canis*.

Cabe mencionar que es de gran interés orientar las futuras investigaciones hacia la detección de este patógeno en distintas matrices, tales como semen y torulados vaginales; además de realizar un estudio más amplio de especificidad de los partidores, considerando la gran cantidad de genomas ingresados al GeneBank® de las distintas especies bacterianas del género, como también de bacterias cercanas filogenéticamente.

BIBLIOGRAFÍA

AL-SOUD, W.; RÅDSTRÖM, P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39(2):485-493.

ARÁNGUIZ, V. 2011. Determinación de la sensibilidad analítica de una prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de Brucelosis Canina. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 18 p.

BAILY, G.; KRAHN, J.; DRASAR, B.; STOKER, N. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271-275.

BOERI, E.; ESCOBAR, G.; AYALA, S.; SOSA-ESTANI, S.; LUCERO, N. 2008. Canine brucellosis in dogs in the city of Buenos Aires. *Medicina (B. Aires).* 68(4):291-7.

BORIE, C. 2014. Situación actual de la brucelosis canina en Latinoamérica **In:** II Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Santiago, Chile. 13-14 noviembre 2014. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

BORIE, C.; GALARCE, N. 2015. *Brucella canis*. *Rev. Chil. Infectol.* 32(2):219-220.

CFSPH. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. 2012. Canine Brucellosis: *Brucella canis*. [en línea]. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf> [consulta: 26-03-2015]

CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. [en línea] <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/09/articles-30555_recurso_1.pdf> [consulta: 15-01-2016]

DE OLIVEIRA, M.; VALE, V.; KEID, L.; FREIRE, S.; MEYER, R.; PORTELA, R.; BARROUIN-MELO, S. 2011. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res. Vet. Sci.* 90(3):425-431.

GAO, G.; LI, J.; LI, T.; ZHANG, Z.; WANG, L.; YUAN, X.; WANG, D. 2012. Complete genome sequence of *Brucella canis* strain 118, a strain isolated from canine. *J. Bacteriol.* 194(23):6680.

GÓMEZ, V. 2007. Seroprevalencia de Brucelosis Canina por *B. canis* en clínicas veterinarias del Gran Santiago 2002 – 2003. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 52 p.

GREENE, C., CARMICHAEL, L. 2012. Canine brucellosis. **In:** Greene C. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4^a ed. Elsevier Saunders. St. Louis, MO. Pp. 398-411.

HINIĆ, V.; BRODARD, I.; THOMANN, A.; CVETNIĆ, Ž.; MAKAYA, P.; FREY, J.; ABRIL, C. 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Meth.* 75(2):375-378.

HORMAZÁBAL, J.; CORBETT, C.; ANTONATION, K.; ARAYA, P.; FLORES, R.; DUEBY, O.; PIDAL, P. 2014. Identificación taxonómica de aislamientos de *Brucella spp.* de casos humanos, aislados en hospitales chilenos 2009-2014. **In:** XXXI Congreso chileno de infectología, Puerto Varas. 12-15 noviembre 2014. Sociedad Chilena de Infectología. pp.18

KANG, S.; HER, M., KIM, J.; KIM, S.; KO, K.; HA, Y.; JUNG, S. C. 2011. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microb.* 77(18):6726-6728.

KANG, S.; LEE, S.; KIM, J.; LEE, K.; KIM, S.; LEE, H.; SUNG, S.; HEO, Y.; JUNG, S.; HER, M. 2014. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37(4):237-241.

KAUFFMANN, L.; BJORK, J.; GALLUP, J.; BOGGIATTO, P.; BELLAIRE, B.; PETERSEN, C. 2014. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction analysis. *Zoonoses. Public. Health.* 61(1):48-54.

KEID, L.; SOARES, R.; MORAIS, Z.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. 2004. *Brucella spp.* isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35(1-2):161-166.

KEID, L.; SOARES, R.; VIEIRA, N.; MEGID, J., SALGADO, V.; VASCONCELLOS, S.; DE COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. 2007a. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S-23S rDNA interspacer. *Vet. Res. Commun.* 31(8):951-965.

KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; CHIEBAO, D.; SALGADO, V.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. 2007b. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology.* 68(9):1260-1270.

KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; CHIEBAO, D.; MEGID, J.; SALGADO, V.; RICHTZENHAIN, L. 2007c. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. *Theriogenology.* 67(7):1203-1210.

KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; MEGID, J.; SALGADO, V.; RICHTZENHAIN, L. 2009. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Res. Vet. Sci.* 86(1):22-26.

KEID, L.; SOARES, R.; VASCONCELLOS, S.; SALGADO, V.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. 2010. Comparison of a PCR assay in whole blood and serum specimens for canine brucellosis diagnosis. *Vet. Rec.* 167(3):96-99.

KEID, L.; DINIZ, J.; OLIVEIRA, T.; FERREIRA, H.; SOARES, R. 2015. Evaluation of an Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. *Reprod. Domest. Anim.* 50(6):939-944.

KIM, S.; LEE, D.; SUZUKI, H.; WATARAI, M. 2006. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 68(6):615-618.

LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCIA-YOLDI, D.; MARIN, C.; DE MIGUEL, M.; MUNOZ, P.; BLASCO, J., GARIN-BASTUJI, B. 2008. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 46(10):3484-3487.

LÓPEZ-GOÑI, I.; GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C.; DE MIGUEL, M.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRI, C.; GARIN-BASTUJI, B. 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 154(1):152-155.

LORCA, V.; BORIE, C.; CRAVERO, S.; NAVARRO, C.; 2013. Detección molecular de *Brucella canis* mediante partidores diseñados *in silico*. **In:** XII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 23-26 septiembre 2013. CONICET - Ministerio de Salud de La Nación.

LUCERO, N.; ESCOBAR, G.; AYALA, S.; JACOB, N. 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 54(5):457-461.

MAKLOSKI, C. 2011. Canine Brucellosis Management. *Vet. Clin. Small. Anim.* 41(6):1209-1219.

OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2014. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. [en línea] cap.1.1.5. **In:** Manual Terrestre de la OIE 2014. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf> [consulta: 14-06-2015]

OLSEN, S.; PALMER, M. 2014. Advancement of Knowledge of *Brucella* over the Past 50 Years. *Vet. Pathol.* 51(6):1076-1089.

OPEL, K.; CHUNG, D.; MCCORD, B. 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J. Forensic. Sci.* 55(1):25-33.

PERCIN, D. 2013. Microbiology of *Brucella*. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* 8(1): 13-17.

PINOCHET, L.; MORA, L.; SÁNCHEZ, M. L.; CONTRERAS, C. 1979. Investigación Serológica Canina en Criaderos del Área Metropolitana. II Congr. Nac. de Med. Vet. Valdivia Chile 37.

QUEIPO-ORTUÑO, M.; COLMENERO, J.; MUÑOZ, N.; BAEZA, G.; CLAVIJO, E.; MORATA, P. 2006. Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by real-time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J. Urol.* 176(5):2290-2293.

RUÍZ, J.; GIRALDO, C.; LÓPEZ, L.; CHICA, J. 2010. *Brucella canis* seroprevalence in stray dogs from " Centro de Bienestar Animal" La Perla", Medellín (Colombia), 2008. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 23(2):166-172.

SÁNCHEZ, M. L.; CASTILLO, D.; PINOCHET, L.; ABALOS, P.; LASSERRE, M. 1986. Utilización de dos técnicas serológicas diagnósticas en brucelosis canina. *Res. VI Congr. Nac. Med. Vet., Santiago SA.*147

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.; ORTIZ-ROMÁN, L.; CASTRILLÓN-SALAZAR, L.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; OLIVERA-ANGEL, M. 2014. Application of a polymerase chain reaction test for the detection of *Brucella canis* from clinical samples of canines and humans. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 27(1):3-11.

SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M.; ISAZA, J.; ALZATE, J.; OLIVERA-ANGEL, M. 2015. Comparison of *Brucella canis* genomes isolated from different countries shows multiple variable regions. *Genomics.* 106(1):43-51.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. 2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113(5):1014-1026.

TRONCOSO, I.; ROJAS, R.; FISCHER, C.; NÚÑEZ, C.; ARRUÉ, K. 2013. Brucelosis en criaderos caninos: seroprevalencia de 33 casos. *Hospitales Veterinarios.* 7:50-55.

WATTAM, A.; WILLIAMS, K.; SNYDER, E.; ALMEIDA, N.; SHUKLA, M.; DICKERMAN, A.; YOO, H. 2009. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J. Bacteriol.* 191(11):3569-3579.

WANG, Y.; KE, Y.; ZHEN, Q.; YUAN, X.; XU, J.; QIU, Y.; CHEN, Z. 2012. Complete genome sequence of *Brucella canis* BCB018, a strain isolated from a human patient. *J. Bacteriol.* 194(23):6697-6698.

WILSON, I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10):3741-3751.

XAVIER, M.; SILVA, T.; COSTA, É.; PAIXÃO, T.; MOUSTACAS, V.; JÚNIOR, C.; TSOLIS, R. 2010. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet. Microbiol.* 145(1):158-164.

ZAMORA, J.; ALONSO, O.; MARTÍN R. 1980. Brucelosis canina en Valdivia. Chile. *Zentralbl. Veterinarmed.* 27:149.

Anexo 1

Protocolos de hemocultivo y CIEF aplicados en el laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (LB-FAVET)

Hemocultivo

Se cultivaron 3 mL de sangre en 30 mL caldo Tripticasa Soya (Difco®) a 37° C en condiciones aerobias por 30 días. Se obtuvieron subcultivos en agar Tripticasa Soya (Difco®) con suero bovino cada 5 días, a 37° C bajo condiciones aeróbicas. Los subcultivos se incubaron por 48-72 h. Si luego de este tiempo no se observaba crecimiento de colonias, se continuó con la incubación hasta, por lo menos, los 21 días. Se identificó a *Brucella canis* por tinción Gram, características morfológicas de las colonias y aglutinación con suero anti-*B. canis*.

CIEF

Se prepararon portaobjetos con 3 mL de agarosa al 1% en buffer Barbital Sódico pH 8.6, imprimiendo pocillos equidistantes entre sí. Se registraron los sitios de ubicación de controles positivos, controles negativos y suero(s) en estudio. Luego se cargaron los pocillos con el suero control positivo (diluido en proporción 1:1 con solución tope Sorensen), el antígeno (diluido en proporción 1:100 con solución tope Sorensen) y el suero obtenido de los donantes. Se realizó electroforesis a 220 V con 7,5 mA por cada portaobjeto durante 2,5 horas. La lectura de las bandas de precipitación se realizó previa inmersión en citrato de sodio al 5% para eliminar reacciones inespecíficas de precipitación.