



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

**EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN
PLACA CON 2 MERCAPTOETANOL PARA EL DIAGNÓSTICO DE**
Brucella canis

Sofía Salgado Murillo

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

**EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN
PLACA CON 2 MERCAPTOETANOL PARA EL DIAGNÓSTICO DE
*Brucella canis***

Sofía Salgado Murillo

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

Nota Final:

FIRMA

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE P.

PROFESOR CORRECTOR: PEDRO ABALOS P.

PROFESORA CORRECTORA: ALICIA VALDÉS O.

SANTIAGO, CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A mis padres, Mónica Murillo y Oscar Salgado, por su incansable apoyo y permitirme el privilegio de encontrar mi vocación y finalmente estudiar dos carreras. A mis hermanas Javiera y Beatriz por su cariño incondicional.

A mi profesora guía, Dra. Consuelo Borie por su inagotable paciencia y voluntad de ayudar y apoyar cuando fuese necesario, sus acertados comentarios, correcciones y críticas en lo que respecta a la realización de la memoria y mucho más.

A mis profesores correctores, Dra., Alicia Valdés y Dr. Pedro Abálos por su excelente disposición y sus correcciones y comentarios que fueron claves para llevar esta memoria por un buen camino y a un buen término.

Al Dr. Nicolás Galarce por estar constantemente dispuesto a acompañarnos, ayudarnos y revisar nuestro trabajo, incluso cuando estuvo a miles de kilómetros de distancia y siempre con una sonrisa.

A todos los funcionarios del Dpto. Medicina Preventiva Animal que tuvieron una incansable paciencia para apoyar y cuidar nuestro trabajo en el laboratorio y responder mil veces las mismas preguntas.

A mis compañeros de Memoria, Consuelo Bittner, Javier Masías, Francisco Carmona e Ignacio Silva que hicieron de esta experiencia una grata y acompañada aventura.

A mis amigos de la vida por el inagotable cariño y constante complicidad. Sobre todo a Ignacio por su honestidad, por enseñarme que sin desafíos la vida no tiene sentido y que la incomodidad es necesaria para avanzar.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE CAPÍTULOS	i
ÍNDICE DE GRÁFICOS	iii
ÍNDICE DE IMAGENES	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICO	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. Materiales para implementar 2ME-RSAT	16
- Sueros Sanguíneos	16
- Antígeno	16
- Reactivo	17
2. Implementación de la prueba de 2ME-RSAT	17
- Determinación de las diluciones de antígeno y antisuero control positivo	17

- Determinación de Sensibilidad y Especificidad del 2ME-RSAT	17
- Concordancia de 2ME-RSAT con las pruebas de CIEF y ELISA	18
3. Técnica de CIEF	18
4. Medidas de bioseguridad	19
- Medidas de seguridad para la manipulación del Beta-Mercaptoetanol concentrado	19
RESULTADOS	21
1. Implementación y Determinación de las diluciones de antígeno y antisuero control positivo.	21
2. Determinación de Sensibilidad y Especificidad del 2ME-RSAT	21
3. Determinación de las concordancias entre CIEF y 2ME-RSAT y ELISA y 2ME-RSAT para sueros del servicio de diagnóstico de FAVET	22
	24
DISCUSIÓN	
CONCLUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	31
PLANIFICACIÓN	37
ANEXOS	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICOS

Pág.

- | | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Efecto de la Brucelosis canina sobre índices reproductivos en un criadero en Estados Unidos. | 5 |
|----------|--|----------|

ÍNDICE DE IMAGENES

IMAGENES

Pág.

- | | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Fotografía de la reacción de aglutinación con la técnica de 2ME - RSAT con suero de animales experimentalmente infectadas y antígeno de <i>B. canis</i> inactivada. | 21 |
|----------|---|-----------|

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS		Pág.
1	Tabla de contingencia para cálculo de Sensibilidad y Especificidad del 2ME-RSAT para el “screening” diagnóstico de <i>B. canis</i> , a partir de sueros controles positivos y negativos, utilizando la técnica de CIEF de referencia.	22

RESUMEN

La brucelosis canina constituye un problema para la salud animal y humana, que cobra especial relevancia en los criaderos caninos, debido a sus mecanismos de transmisión, alto potencial de diseminación en estos y a los efectos perjudiciales que causa en la fertilidad de los animales afectados. El diagnóstico definitivo es el diagnóstico directo mediante cultivo, pero por inconvenientes prácticos y costos asociados es poco factible de aplicar en criaderos que busquen diagnosticar a todos sus animales. Surge entonces la serología como alternativa de diagnóstico indirecto. Dentro de estas técnicas, la denominada prueba de aglutinación rápida en placa con 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT), se consideró como una atractiva alternativa de “screening” para el diagnóstico de *Brucella canis* en Chile. Esto dada su rapidez en la obtención de resultados, facilidad de implementación y bajo costo

La presente memoria de título implementó la prueba de 2ME-RSAT, ya utilizada en otros países, en el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (LaBFAVET). Estableciéndose que presentó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 74,3%, utilizando la prueba de contraelectroforesis (CIEF) como técnica de referencia. Se trabajó con 23 sueros controles positivos de perras experimentalmente infectadas y 39 sueros controles negativos provenientes de perros negativos por CIEF y sin sospecha clínica de *Brucella canis*. El antígeno utilizado fue una suspensión de células inactivadas de *B. canis*.

Se calcularon además las concordancias del 2ME-RSAT con las pruebas de CIEF y ELISA indirecto, actualmente realizadas en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile. La sensibilidad y especificidad obtenidas permiten suponer la utilidad del 2ME-RSAT como “screening” diagnóstico. Pero la concordancia moderada con CIEF ($k = 0.489$) y baja con ELISA ($k = 0.143$), ponen en duda dicha utilidad.

ABSTRACT

Canine brucellosis is a disease that signifies a problem for animal and human health, but has especial significance for breeding kennels, where its transmission mechanisms and high potential for dissemination are important factors, as well as the negative consequences it causes in affected animals. Direct diagnostic through bacteriological culture is the gold standard but due to practical problems and associated costs, it is not a feasible alternative for breeding kennels that seek to test all their animals. Indirect diagnostics through serology is therefore a plausible option. Due to its potential for obtaining results in a short time frame, its simple implementation and low cost, the rapid slide agglutination test with 2-Mercaptoethanol (2ME-RSAT) was considered an attractive alternative for the screening diagnostic of *Brucella canis*.

This thesis implemented the 2ME-RSAT test, already used in other countries, in the Laboratory of Bacteriology at de Faculty of Veterinary Sciences of the University of Chile. Determining a sensitivity of 100% and specificity of 74,3%, with counter-immunoelectrophoresis (CIEP) as the referential technique. The materials employed were: 23 positive control serums obtained from experimentally infected bitches, 39 negative control serums from dogs negative by CIEP and without clinical signs of canine brucellosis. The antigen used was a suspension of inactivated *B. canis* cells. The agreement with CIEP and indirect ELISA techniques, both performed at the University of Chile Veterinary Diagnostics Laboratories, was also calculated.

The sensitivity and specificity levels obtained suggest the plausibility of employing 2ME-RSAT as a diagnostic screening test. However the agreement results, moderate for CIEP ($k = 0.489$) and low for ELISA ($k = 0.143$), cast doubts on its usefulness. Various factors could explain this contradiction and are detailed in the discussion.

Key Words: *Brucella canis*, serology, 2ME-RSAT, sensitivity, specificity, agreement

INTRODUCCIÓN

Brucella canis (*B. canis*), es la primera causa de infertilidad en criaderos caninos en el mundo y por su potencial zoonótico representa también un riesgo para la salud humana, por lo que se hace necesario contar con estrategias de control que permitan pesquisar la enfermedad tempranamente y evitar su diseminación.

La brucelosis canina constituye entonces un problema contingente para las Ciencias Veterinarias y Salud Pública y es además un tema de relevancia económica para quienes se dedican a la reproducción y venta de perros. Esto último debido a su mecanismo de contagio, que por su rapidez y altísima efectividad, la hacen una enfermedad de rápida diseminación en lugares donde se concentran y reproducen dichos animales.

Un paso clave entonces en la búsqueda del control de esta enfermedad es el diagnóstico temprano y si bien se reconoce el rol del diagnóstico directo en la detección precoz de la infección, por motivos de tiempo, costo y disponibilidad de muestras se continúa prefiriendo el diagnóstico indirecto mediante análisis serológicos. Entre las técnicas serológicas existentes, el uso de la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT) con 2-mercaptoetanol (2ME) se posiciona como una interesante alternativa de “screening” para el diagnóstico de *Brucella canis*, ya que es fácil de implementar, es económica, rápida y permite minimizar la detección de animales falsos positivos, situación habitual en las pruebas de aglutinación. Dado que en Chile este método no se realiza, el objetivo de este estudio es la evaluación de la técnica de 2ME-RSAT para la detección de anticuerpos contra *Brucella canis* utilizando un antígeno a base de células inactivadas de *B. canis*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Brucella canis es un cocobacilo Gram negativo de vida intracelular facultativa perteneciente al género *Brucella*; junto a la especie *Brucella ovis* son las únicas que forman colonias naturalmente rugosas (Wanke, 2004), debido a la composición del lipopolisacárido (LPS) de su pared celular que carece o tiene una muy baja cantidad de polisacárido O (PO). Esta característica estructural de la pared también es responsable de la reactividad cruzada entre *B. ovis* y *B. canis* y les otorga algunas características particulares de patogenicidad (Pei *et al.*, 2008). Además de *B. canis*, propia de cánidos domésticos y salvajes (CFSPH, 2012), existen otras tres especies que pueden afectar ocasionalmente a los perros: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, pero no son de importancia en términos clínicos ni epidemiológicos (Wanke, 2004).

El impacto potencial de esta bacteria que afecta al animal de compañía más frecuente de encontrar en los hogares, el perro (*Canis lupus familiaris*), es un tema creciente y relevante si se toma en cuenta que en Chile se estima una población canina de casi tres millones en lo que respecta solamente animales con dueño (Minsal, 2010). En cuanto a población canina sin dueño, no existen cifras oficiales, pero se estima que podría llegar hasta el millón de animales (Lepe, 2014). Además, estudios realizados en Santiago indican que un 84% de los perros con dueño deambulan en las calles sin sujeción, ni control (Ibarra *et al.*, 2006). Existe entonces una amplia población de los hospederos susceptibles que, debido al escaso control sobre su circulación, se encuentra en riesgo de contagio con *Brucella canis* (Makloski, 2011).

El contexto favorable para su transmisión responde a la facilidad con que animales infectados y no infectados pueden entrar en contacto, produciéndose la transmisión y propagación de la bacteria. El principal mecanismo de transmisión de *B. canis* es por la vía genital, siendo esta una enfermedad de transmisión sexual, pero pudiendo ocurrir la contaminación también por la vía oral y oronasal, e incluso el ingreso de la bacteria se puede producir a través de lesiones en la piel (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012). Otro mecanismo frecuente de infección es el contacto con restos de membranas fetales o productos del aborto y los fómites pueden ser asimismo una vía de contagio sobre

todo en condiciones de alta humedad, bajas temperaturas y ausencia de luz solar (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012).

La infección con *Brucella canis* tiene como posibles consecuencias clínicas un amplio número de signos: el aborto tardío es característico (días 45-55 de gestación) pero también es común la reabsorción embrionaria, y pueden asimismo nacer cachorros débiles o aparentemente sanos que desarrollan la enfermedad posteriormente. En el macho se observa primero una epididimitis severa y prostatitis, y luego atrofia testicular que suele generar infertilidad irreversible. Los signos no reproductivos son inespecíficos: linfadenitis (lo más común), pérdida de peso y brillo del pelaje, anorexia, intolerancia al ejercicio, letargia o fatiga y pocas veces pirexia. Ocasionalmente pueden producirse manifestaciones graves como disco espondilitis, uveítis crónica, osteomielitis y meningoencefalitis (Wanke, 2004; CFSPH, 2012).

Esta es la signología y mecanismo de transmisión en el caso de los cánidos, pero este patógeno también puede afectar a las personas, donde la infección es consecuencia de contacto con animales infectados, productos del aborto o también fómites. En medicina humana se considera de baja virulencia, en comparación a otras especies del género *Brucella*, pues se han documentado pocos casos; es así que desde 1973 al 2010, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de USA (CDC) ha aislado *B. canis* de aproximadamente 50 personas (Borie, 2014). Sin embargo, se estima una enfermedad sub diagnosticada debido a sus síntomas inespecíficos, escasa sospecha por parte de los médicos e infrecuente realización de pruebas diagnósticas específicas (Wanke, 2004; CFSPH, 2012).

La enfermedad en humanos presenta signos clínicos muy variables, los más comunes son semejantes a una gripe, tales como: fiebre, escalofríos, dolores de cabeza y mialgias entre otros. Algunos pacientes pueden mejorar espontáneamente mientras que otros desarrollan sintomatología inespecífica e incluso hay quienes sufren de fiebre ondulante. Ocasionalmente existen también casos en que la sintomatología se complica y los pacientes pueden desarrollar artritis, espondilitis, fatiga crónica, epidídimo-orquitis, alteraciones neurológicas, anemia, abscesos internos, nefritis, vasculitis, endocarditis y dermatitis.

Además, existen ciertos grupos que se encuentran en mayor riesgo frente a la infección tanto para el contagio y en términos de sufrir complicaciones, como son los niños, embarazadas, tercera edad e individuos inmunodeprimidos (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012).

En cuanto a la situación epidemiológica de esta bacteria en Chile, específicamente en el caso de los perros, el porcentaje de animales serológicamente positivos en zonas urbanas varía entre un 15-30%, pudiendo alcanzar incluso un 40%. Esto según estudios de seropositividad en poblaciones de perros realizados en los últimos quince años (Borie, 2014). Un estudio publicado hace algunos años, donde se muestrearon aleatoriamente 384 caninos de clínicas veterinarias de las 34 comunas del Gran Santiago, determinó una seroprevalencia de brucelosis canina por *Brucella canis* de un 15,9%, realizando el diagnóstico mediante contrainmunolectroforesis con antígeno LPS-R de *Brucella ovis* (Gomez, 2007).

En Chile, para humanos se describe una seroprevalencia del 4% en personas con riesgo ocupacional (veterinarios y peluqueras) (Valenzuela *et al.*, 2005). Además, el laboratorio de bacteriología de la Pontificia Universidad Católica (PUC) ha detectado la infección en 16 pacientes entre el 2009 y 2014, mediante detección de anticuerpos (Borie, 2014). Por otra parte y en el mismo periodo, la sección de bacteriología del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) entre el 2009 y 2014, identificó mediante cultivo 3 casos de infección humana por *B. canis* (Hormazábal *et al.*, 2014).

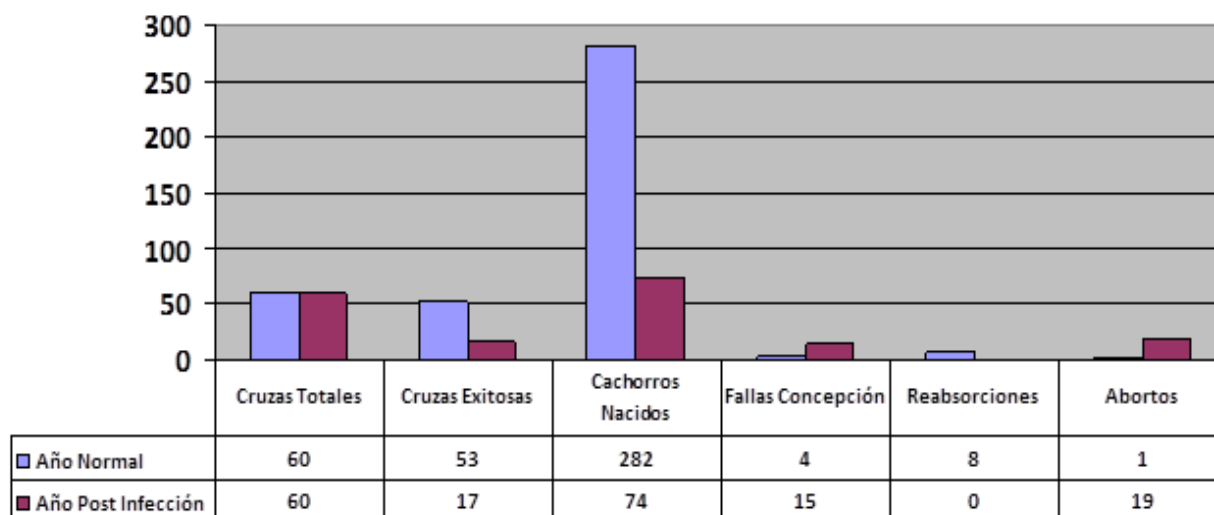
Se sabe entonces, que la bacteria en cuestión circula en la población canina y humana, que tiene efectos nocivos sobre ambas poblaciones y que, dada la realidad de tenencia de perros en el país, existen condiciones que favorecen su diseminación. Pero existe además otro espacio donde se dan condiciones propicias para la mantención y transmisión de *B. canis*; estos son los criaderos caninos, donde existe gran proximidad entre los animales y está el hecho que su actividad primordial sea la reproducción.

No existen muchos estudios publicados respecto a la prevalencia en criaderos chilenos, pero investigaciones realizadas durante los años 80 indican que en 9 criaderos de la Región

Metropolitana se encontró un 13,5% de animales seropositivos, donde cabe destacar el 40% de positividad que se encontró en uno de ellos. Otro estudio más reciente llevado a cabo el 2013, en 3 criaderos de Curicó, encontró una prevalencia promedio de 18,18% para *Brucella canis*, estando el organismo presente en todos los establecimientos involucrados (Tuemmers *et al.*, 2013).

Este patógeno implica importantes pérdidas para los establecimientos dedicados a la reproducción y venta de cachorros, pues provoca fuertes caídas en los parámetros reproductivos. En un estudio realizado por Pollock (1979), se describen en términos cuantitativos las pérdidas obtenidas como consecuencia de la infección con *B. canis* en un criadero, mediante la comparación de parámetros reproductivos de un año normal, libre de *Brucella canis*, con un año post infección. Se observa entonces, en el Gráfico 1 que, para un número equivalente de 60 cruzas en ambos años, en el año post infección existió un descenso marcado en los indicadores reproductivos estudiados.

Gráfico 1: Efecto de la Brucelosis canina sobre índices reproductivos en un criadero en Estados Unidos.



(Gráfico de elaboración propia en base a los datos de Pollock, 1979)

La disminución de los parámetros estudiados implica además que el número de cachorros obtenidos se vea muy afectado, tanto así que los cachorros/hembra/año, un indicador sumamente importante en el contexto de los criaderos, disminuye de 5,7 para un año

normal a 1,5 en el caso de un año post infección. Queda entonces de manifiesto el efecto perjudicial que tiene *B. canis* sobre estos parámetros (Pollock, 1979).

Pero además de los efectos mencionados, referidos predominantemente a las hembras, *Brucella canis* tiene fuertes repercusiones negativas sobre el potencial reproductivo del macho. Provoca ruptura de la barrera hematotesticular, lo que tiene como efecto una extravasación de espermatozoides y la consecuente agresión por parte del sistema inmune ya que se producen anticuerpos antiespermatozoides. Esto se traduce en una serie de anomalías en los espermios (aglutinación cabeza-cabeza; colas enrolladas y separación cola-cabeza, entre otras), disminuyendo la fertilidad del animal infectado, provocando finalmente una pérdida irreversible de esta en los estadios crónicos de la enfermedad (Borie *et al.*, 2002).

Se está entonces frente a una enfermedad que tiene efectos indeseados en el bienestar humano y animal, presenta escasas posibilidades terapéuticas y hasta la fecha no existen posibilidades de vacunación. Además, es altamente contagiosa y afecta fuertemente al sistema reproductivo, lo que implica que los criaderos sean un punto crítico para su control y prevención. Es primordial por ende para el control en criaderos que los animales infectados sean rápidamente detectados y eliminados del sistema (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012).

El diagnóstico es por lo tanto es un aspecto clave para detener y prevenir la diseminación de este patógeno. En lo que respecta al diagnóstico directo, se tiene el método que constituye el diagnóstico definitivo de *B. canis*: el aislamiento bacteriológico. Se puede hacer a partir de muestras sanguíneas, muestras del tracto genital, semen, descargas vaginales, placenta, o restos fetales (Wanke, 2004).

Las muestras se pueden sembrar en medios comunes como agar de Triptosa o medios modificados como el medio Thayer-Martin o el medio de Farrell y se incuban aeróbicamente a 37°C. El crecimiento bacteriano puede ser observable a partir de las 72 horas, e inicialmente se observan pequeñas colonias transparentes que suelen tornarse

mucoides luego de algunos días de incubación (Greene, 2000; CFSPH, 2012; Borie y Galarce, 2015).

Para identificar la bacteria se recomienda realizar una serie de pruebas, partiendo por una tinción Gram (se observará un cocobacilo Gram negativo), una tinción Zielh Nielsen modificada (se observará de color rojo) y también se puede efectuar una tinción de Koster modificada (se observará rojo naranja con fondo azul). Adicionalmente se pueden utilizar pruebas bioquímicas que, junto con la morfología, permiten identificar el género *Brucella*, y diferenciar entre sus distintas especies. Dentro de las pruebas bioquímicas están: prueba de requerimientos de CO₂, prueba de inhibición del desarrollo frente a colorantes (Tionina y Fuscina), producción ácido sulfhídrico, desdoblamiento de urea, presencia de hemólisis, reducción de nitratos, fermentación de lactosa, y fermentación de glucosa. De tratarse de *Brucella canis*, será CO₂ independiente, capaz de multiplicarse en la Tionina, pero no en la Fucsina básica y las pruebas que miden desdoblamiento de urea y reducción de nitratos debiesen resultar positivas, mientras que las que detectan hemólisis, ácido sulfhídrico y fermentación de lactosa y glucosa serán negativas (Greene, 2000; Borie y Galarce, 2015).

Si bien el aislamiento es considerado el “gold standard”, cuenta con algunos inconvenientes prácticos. En el caso del hemocultivo se requiere un mínimo de 5 ml de sangre con anticoagulante y si bien esta prueba permite pesquisar la bacteria tempranamente, debido a que se presenta bacteremia entre las 4 a 6 semanas post infección, tiene algunas desventajas: como el crecimiento lento de la bacteria, pudiendo demorarse desde 72 horas hasta 21 días y además un hemocultivo negativo no descarta la infección por ser la bacteremia de carácter intermitente (Wanke, 2004). Para el cultivo de muestras no sanguíneas, en el caso de la orina la bacteria se elimina durante los primeros tres meses post infección, en el caso del semen se requieren altas concentraciones del microorganismo para su aislamiento por lo que el cultivo también es factible durante los tres primeros meses de la infección. En lo que respecta a las muestras de tejidos, la presencia de la bacteria es variable y el crecimiento se suele observar a partir de 48 horas de incubación. Además, cuando no se trata de hemocultivo, existe el problema de contaminación bacteriana, por lo que muchas veces se hace necesario el uso de medios selectivos asociados a antibióticos, lo

cual puede dificultar el crecimiento de *B. canis* (Wanke, 2004; Hollet, 2006; Lucero *et al.*, 2008; Makloski, 2011; Borie, 2014; Borie y Galarce, 2015).

Otro método de diagnóstico directo es la detección genómica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una alternativa sensible y específica, pero de mayor costo que el cultivo y que enfrenta el problema de un elevado porcentaje de homología genómica (identidad nucleotídica mayor a 90%) entre las especies del género *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. pinnipediae* y *B. cetaceae*) con una relación mucho más estrecha entre *B. suis* y *B. canis* (mayor a 94%). Este hecho explica que aún se estén desarrollando partidores que amplifiquen un fragmento específico para esta especie (Olsen y Palmer, 2014).

En este contexto, el año 2008 Hinić *et al.*, emplearon una delección específica en el cromosoma II de la cepa RM 6/66 de *B. canis*, para diferenciarla de las otras especies del género; pero se observó el mismo patrón en la cepa de referencia de *B. canis* y *B. suis* biovar 4. El mismo año López-Goñi *et al.*, (2008) implementaron en diversos laboratorios de Europa, un método denominado *Bruce-ladder* para la detección y diferenciación de las mencionadas especies del género *Brucella*. Sin embargo, el fragmento que se utilizó como diferenciador: un fragmento de 749 pares de bases que en teoría estaría presente en *B. suis* y ausente en *B. canis*, fue encontrado en 9 de 21 cepas de *B. canis* examinadas. Debido a lo anterior, es que el año 2011 los mencionados investigadores diseñan una nueva versión de este PCR múltiplex, denominada *Suis-ladder*, que pudo diferenciar satisfactoriamente los 5 biovars de *B. suis* de *B. canis* (López-Goñi *et al.*, 2011). Además, el mismo año Kang *et al.*, (2011) diseñan otro PCR múltiplex para la diferenciación de todas las especies de *Brucella*, para lo cual se emplea un segmento de 766 pares de bases (pb) a partir del cual se logró distinguir correctamente *B. canis* de *B. suis* (Kang *et al.*, 2011).

Otro estudio, realizado el año 2013 en Chile logró diferenciar adecuadamente *B. canis* de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* mediante el empleo de partidores de alrededor de 430 pb observables sólo en *B. canis* (Lorca *et al.*, 2013). Más recientemente, el año 2014, Kauffman *et al.*, desarrollaron una reacción de PCR cuantitativa para detectar *B. canis* en

muestras de sangre entera, torulados vaginales, orina, hígado y tejido del tracto genitourinario. Esta prueba fue capaz de detectar la bacteria previo a la seroconversión y obtuvo buenos niveles de sensibilidad pero bajos niveles de especificidad en muestras de fluidos vaginales.

Además del problema de especificidad, la sensibilidad del diagnóstico por PCR también se ve afectada por la matriz en la cual se encuentra la bacteria, donde muchas veces existen inhibidores de la reacción, haciendo necesario establecer los límites de detección en las distintas muestras y mejorar los protocolos para eliminar estos inhibidores (Olsen y Palmer, 2014).

Debido a los mencionados inconvenientes práctico-metodológicos del diagnóstico directo, es que surge la serología como alternativa de diagnóstico indirecto, que mide la presencia de anticuerpos específicos en el paciente. Los resultados de estas pruebas varían en sensibilidad y especificidad y también en el tiempo de obtención de positividad según el antígeno utilizado, sea este de la pared celular de la bacteria (LPS-R) o bien proteínas citoplasmáticas comunes al género *Brucella* (Wanke, 2004).

Los métodos diagnósticos más usados son: Prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT), con o sin 2-mercaptoetanol (2-ME); Prueba de aglutinación lenta en tubo (TAT), con o sin 2-ME; Inmunodifusión en gel de agar (AGID); Contrainmunolectroforesis (CIEF); Técnica de ELISA, Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) e Inmunocromatografía (IC) (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012; Borie, 2014).

1.1. RSAT: Es una técnica de aglutinación que se basa en la formación y reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo. Esta emplea antígenos particulados, como por ejemplo suspensiones celulares o microorganismos, que al entrar en contacto con un antisuero que contenga los anticuerpos correspondientes generan una reacción de aglutinación. Vale mencionar la importancia del fenómeno de prozona para las técnicas de aglutinación, por cuanto la reacción ocurrirá solo si tanto la concentración de antígeno como la de anticuerpo

son adecuadas, es decir que no exista un exceso de ninguno de los componentes (Castillo y Valenzuela, 2002).

La mencionada técnica tiene entre sus ventajas el hecho que es simple y rápida ya que demora alrededor de dos minutos y requiere solamente del suero sanguíneo del paciente y el antígeno correspondiente; Usualmente una suspensión de *B. ovis* (que tiene reactividad cruzada con *B. canis*) teñida con Rosa de Bengala para facilitar la observación de la reacción a simple vista (Wanke, 2004). Además es posible utilizarla tempranamente, hecho que junto a la simpleza y rapidez son características necesarias si el objetivo es realizar una detección precoz en el marco del control de *B. canis* en criaderos caninos. Esta técnica puede ser empleada desde las 3 a 4 semanas post infección hasta aproximadamente 3 meses post bacteremia (Wanke, 2004). Sin embargo, cuenta con el inconveniente de presentar bajos porcentajes de sensibilidad y especificidad. Según un estudio realizado por Keid *et al.*, el año 2009, estos serían un 70,58% y 83,34% respectivamente, utilizando como referencia el diagnóstico directo (cultivo y PCR).

1.2. 2ME - RSAT: Esta prueba es una modificación del RSAT que contempla la adición del reactivo 2-mercaptoetanol a los sueros a analizar, para así mejorar su especificidad. Será abordada con mayor detalle más adelante.

2. TAT: Es una técnica de aglutinación que utiliza antígeno de pared celular de *Brucella ovis*, de carácter semi cuantitativa y con detección de positividad posterior al RSAT. El tiempo de detección de positividad se extiende desde las 5 a 8 semanas post infección hasta los 3 meses post bacteremia (Wanke, 2004).

Esta técnica tiene niveles de sensibilidad tan altos como un 100%, pero baja especificidad, del orden del 66,67%, lo cual implica la frecuente obtención de falsos positivos (Talukder *et al.*, 2011). Además, esta técnica cuenta con el inconveniente de que existen discordancias entre los títulos de anticuerpos que permiten identificar una muestra como positiva (puntos de corte), lo más común es considerar un título de 2:200 o más como indicador positivo de

infección, pero hay laboratorios que consideran muestras positivas con títulos más bajos (Wanke, 2004; Borie, 2014).

2.2 2ME - TAT: Esta es una modificación de la prueba de aglutinación lenta en tubo, donde se realiza la adición del reactivo 2-mercaptoetanol a los sueros sanguíneos que serán procesados, para aumentar la especificidad de la técnica. Sin embargo, aún no existen presentaciones comerciales del 2ME-TAT (Wanke, 2004; Borie, 2014).

3. AGID: Corresponde a una técnica de precipitación. Estas utilizan antígenos solubles que, al entrar en contacto con el anticuerpo correspondiente, forman complejos antígeno-anticuerpo que se visualizan como bandas, anillos o arcos de precipitado en un gel de agar. En este caso es importante considerar la zona de equivalencia, condición necesaria para que se produzca exitosamente la reacción, ya que esta depende de la relación molar entre antígeno y anticuerpo, lo que implica que sea necesario contar con concentraciones iguales de ambos reactantes (Castillo y Valenzuela, 2002). Además, puede llevarse a cabo utilizando tanto antígenos citoplasmáticos como antígenos de la pared celular (Wanke, 2004).

La técnica de AGID detecta positividad con un margen variable que va desde las 4 a 12 semanas post infección y se extiende hasta los 36 meses post bacteremia cuando se utilizan antígenos citoplasmáticos. Demora tan solo 72 horas en obtener resultados (Wanke, 2004; Borie, 2014), y tiene niveles aceptables de sensibilidad (85%) y buenos niveles de especificidad (94%) (Wanke *et al*, 2012).

4. CIEF: Es así mismo una técnica de precipitación que se realiza en gel de agar y funciona mediante el empleo de un tampón de electroforesis cuyo pH es el responsable que el anticuerpo se cargue positivamente y el antígeno negativamente, migrando estos hacia el polo opuesto para formar complejos de unión antígeno - anticuerpo que se visualizan como bandas de precipitado (Castillo y Valenzuela, 2002).

La técnica de CIEF es entonces una muy buena alternativa debido a que es factible de usar desde muy temprano: 3 semanas post infección, hasta 270 días post infección (Borie y Pinochet, 1987; Borie, 2014). Cuenta además con muy buenos porcentajes de sensibilidad: 100% y especificidad: 96,82%, respecto de la técnica de AGID (Laserre, 1984); y un tiempo de espera de no más de 2,5 horas para la obtención de resultados (Borie, 2014).

5. ELISA Indirecto: Esta corresponde a un tipo de enzima - inmunoanálisis, que además de basarse en el reconocimiento antígeno - anticuerpo, donde el antígeno inmovilizado es reconocido por un anticuerpo marcado, requiere de la amplificación de la reacción mediante el empleo de enzimas que generan productos de color mediante su acción sobre distintos sustratos. En este caso se emplea un anticuerpo primario que detecta el antígeno, este es reconocido por un denominado anticuerpo secundario que se encuentra enlazado a la enzima anteriormente mencionada. Esta prueba se efectúa sobre una fase sólida, comúnmente placas de poliestireno, es de carácter no competitivo y la detección suele realizarse mediante espectrofotometría (Castillo y Valenzuela, 2002).

La prueba de ELISA se considera una de las mejores alternativas de diagnóstico serológico ya que pese a que cuenta con un periodo de obtención de positividad que se inicia a las 12 semanas post infección, cuando se emplean proteínas citoplasmáticas como antígeno, este se extiende hasta los 36 meses post bacteremia (Wanke, 2004). Posee muy buenos porcentajes de sensibilidad y especificidad: 100% y 98,8% respectivamente, en relación al cultivo (Escobar *et al.*, 2010).

6. IFAT: Es una prueba inmunohistoquímica o inmunocitoquímica, que mediante la utilización de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente, permite la identificación de una determinada molécula. Esta prueba se denomina de doble capa ya que funciona con un anticuerpo denominado secundario que se encuentra marcado con el fluoróforo (conjugado antiinmunoglobulinas - fluorocromo) y reconoce a la molécula objetivo o anticuerpo primario y se le une generando la reacción fluorescente indicativa de positividad (Castillo y Valenzuela, 2002). Esta técnica cuenta con buenos niveles de

sensibilidad y especificidad: 93% y 98%, respectivamente (VRMD, 1995); pero solo es factible de utilizarse en casos agudos (Wanke, 2004).

7. IC: Se realiza utilizando como base una membrana de nitrocelulosa o nylon a través de la cual migra un complejo inmune, el que está formado en este caso por la unión del antígeno con un conjugado que consiste en el anticuerpo más un marcador. Este complejo será retenido en una zona específica por anticuerpos anti conjugado generándose las líneas indicativas de positividad. En el caso de que no se produzca la unión antígeno - conjugado y por ende la formación del complejo inmune, la muestra y el conjugado migrarán por separado generando solo la banda control, indicativa que la prueba se realizó correctamente (SEIMC, 2009).

La mencionada prueba tiene un tiempo de obtención de positividad que comienza tempranamente a las 3 semanas post infección, pero no se ha determinado cuando este finaliza (Wanke, 2004). Si bien es una prueba que permite obtener resultados rápidamente (demora entre 15 a 20 minutos) y existen “kits” comerciales que facilitan su aplicación, los niveles de sensibilidad son de un 89%, lo cual implica la posibilidad de que haya animales falsos negativos. Según los investigadores, el problema de detección se observa en los casos de infecciones crónicas. Sin embargo, la especificidad es de un 100% (ambos indicadores obtenidos en relación al aislamiento) (Wanke *et al.*, 2012).

Además, para seleccionar una técnica, es importante no solo evaluar su sensibilidad y especificidad, sino también el costo, sobre todo cuando se trata de un criadero ya que este tema es clave cuando lo que se busca es diagnosticar a una gran población de animales. Las alternativas de diagnóstico disponibles en Chile, tanto de diagnóstico directo como indirecto, fluctúan entre los 15 mil a 26 mil pesos por muestra (ver anexo 1.1), lo cual significa un costo muy alto para un criadero que desee realizar pruebas diagnósticas a todos sus animales. Pero entre todos los diagnósticos mencionados existe una alternativa que, si bien no se realiza en Chile, resulta una interesante opción ya implementada en el extranjero. Debido a su rapidez, su escaso número de falsos negativos y bajo costo, la prueba de aglutinación rápida en placa con 2-mercaptoetanol se transforma en una buena alternativa

diagnóstica (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012). Para esta técnica, los costos referenciales en Argentina y expresados en pesos chilenos, van desde los 400 pesos por muestra en laboratorios estatales hasta alrededor de los nueve mil pesos en laboratorios privados (ver anexo 1.2).

La prueba de 2ME-RSAT es una de las más usadas para el “screening” de brucelosis canina, siendo de uso rutinario en Estados Unidos y Argentina (Makloski, 2011). Por su elevado número de falsos positivos, se debe confirmar todo resultado positivo mediante métodos más específicos como AGID, IFI, ELISA, CIEF o si es posible mediante aislamiento. Este método se basa en la detección de anticuerpos contra antígenos de superficie, mayoritariamente el LPS propio de las cepas rugosas (LPS-R), pudiendo utilizar antígenos de *B. ovis* o *B. canis* (Wanke, 2004; Wanke *et al.*, 2012; Borie, 2014).

Esta prueba es fácil de realizar, económica y aplicable en las fases iniciales de la infección, ya que el tiempo de detección de positividad comienza entre las 8 - 12 semanas. En un primer proceso diagnóstico los animales negativos deben ser retesteados algunas semanas más tarde para estar seguros que la negatividad se debe a la ausencia de la infección y no a una fase inicial, donde los bajos títulos de anticuerpos no fueron pesquisados (Wanke, 2004; Makloski, 2011; USDA 2015).

El adicionar 2-mercaptoetanol a la técnica de R-SAT, nace de la necesidad de aumentar la especificidad de esta, pues permite disociar la IgM disminuyendo con ello la probabilidad de reacciones cruzadas con anticuerpos contra otras bacterias, como *Bordetella* spp, *Pseudomonas* spp y *Moraxella* spp (Wanke 2004; CFSPH, 2012). Entonces, el 2ME-RSAT podría ser utilizado como “screening” diagnóstico pues arroja un bajo número de falsos negativos (Wanke, 2004), lo que fue evidenciado por Wanke *et al.*, (2012), donde de 27 perros positivos por cultivo para brucelosis en fase aguda, todos fueron corroborados por el 2ME-RSAT y ELISA. En este mismo estudio no se logró detectar seropositividad por 2ME-RSAT en 6 perros con brucelosis crónica y positivos al cultivo, lo que indicaría que esta prueba tendría escasa utilidad en los casos crónicos.

Por otra parte, Kauffman *et al.* (2014) al analizar 94 perros de un criadero con historial de problemas reproductivos, encontraron 31 perros positivos por serología (2ME-RSAT y AGID), y 39 mediante PCR cuantitativo (qPCR); es decir 8 animales infectados no fueron pesquisados por serología. Esto indica la importancia de considerar los hallazgos clínicos y de anamnesis en conjunto con la serología y/o bacteriología para llegar a un diagnóstico definitivo.

El presente estudio implementó y evaluó el 2ME-RSAT como método de "screening" para la detección de brucelosis canina en el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (LaBFAVET), de tal manera que su bajo costo sea un estímulo para que criaderos realicen dicho análisis y con ello contribuyan al control de esta bacteria en la población canina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar una prueba serológica de aglutinación como “screening” para el diagnóstico de *Brucella canis* en perros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar la prueba de prueba de aglutinación rápida en placa con 2-mercaptoetanol (2ME-RSAT) con una suspensión inactivada de *B. canis*.
2. Establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba serológica 2ME-RSAT respecto de la Contrainmunolectroforesis (CIEF).
3. Determinar la concordancia entre 2ME-RSAT y CIEF y entre 2ME-RSAT y ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales para implementar 2ME-RSAT

1.1 Sueros Sanguíneos

A. Controles Positivos. Se utilizaron 23 sueros positivos a *B. canis* por CIEF con antígeno LPS-R de *B. ovis*, que fueron obtenidos de dos perras adultas inoculadas experimentalmente el año 2001 en LaBFAVET (Sotomayor, 2001) con la cepa patógena de *B. canis* RM 6/66 donada por Leland Carmichael (Cornell University, USA).

- Colorina. Doce sueros obtenidos en los siguientes días post infección (DPI): 18; 25; 46; 59; 81; 102; 123; 165; 186; 206; 226 y 266. Se cuenta además con sueros de los días 6 y 12 post infección que fueron seronegativos por CIEF.
- Preciosa. Once sueros obtenidos en los siguientes días post infección: 25; 32; 38; 53; 59; 81; 102; 165; 206; 246 y 266. Se cuenta además con sueros de los días 6 y 12 post infección que fueron seronegativos por CIEF.

B. Controles Negativos. Se utilizaron 39 sueros negativos por CIEF, provenientes de perros sin sospecha clínica de *B. canis*.

C. Seroteca del servicio de diagnóstico de FAVET:

- 75 sueros: 22 positivos y 53 negativos por CIEF, procesados en LaBFAVET, recibidos en el periodo 2014-2015
- 14 sueros: 7 positivos y 7 negativos a ELISA, gentilmente donados por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

1.2 Antígeno: Suspensión de *Brucella canis* con un recuento de $4,4 \times 10^6$ UFC/mL, inactivada por ebullición a 100°C por 15 minutos donada gentilmente por el memorista Sr. Ignacio Silva (Silva, 2016). Para su obtención *Brucella canis* fue cultivada en agar Tripticasa de Soya (Difco®) por 48 horas a 37° C en condiciones aerobias. Se utilizó la cepa de *B. canis* aislada en el LaBFAVET y mantenida a temperatura de congelación hasta

el momento de su utilización. La cepa fue secuenciada por el Laboratorio FAVET-INBIOGEN (Número de acceso NZ_LGAQ00000000.1)

1.3 Reactivo: β -Mercaptoetanol / 2-Mercaptoetanol, Molecular Biology Grade. No: CAS 60-24-2 – Calbiochem. Se trabajó con una concentración de 0,2 Molar en agua destilada (Lucero *et al.*, 2008).

2. Implementación de la prueba de 2ME-RSAT.

La implementación se realizó en el LaBFAVET y se basó en las descripciones de Badakhsh *et al.*, (1982) y Lucero *et al.*, (2005). Para ello se colocó en un tubo serológico 25 μ L de suero sanguíneo control positivo sin diluir (38 DPI) y 25 μ L de Beta-Mercaptoetanol al 0.2 M, y se mezclaron manualmente por 2 a 3 segundos. Luego, en un portaobjeto se colocó 50 μ L de suero sanguíneo control positivo tratado con beta-Mercaptoetanol y 50 μ L del “stock” de antígeno (*Brucella canis* inactivada, $4,4 \times 10^6$ UFC/mL) y se homogeneizó la mezcla manualmente. Finalmente, luego de 2 minutos se evidenció la aglutinación, a simple vista, sobre fondo oscuro y con luz indirecta.

2.1 Determinación de las diluciones de antígeno y antisuero control positivo.

Una vez implementada la técnica, para disminuir los costos, se determinaron las mayores diluciones de antígeno y antisuero control positivo que permitieron obtener una aglutinación visible, dentro de dos minutos. Para ello, se realizaron una serie de pruebas que por un lado mantenían la cantidad de antígeno fija, variando la cantidad de antisuero, y viceversa, como se ilustra en los esquemas del anexo 2.

2.2. Determinación de Sensibilidad y Especificidad del 2ME-RSAT.

Para establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba de 2ME-RSAT se utilizó como parámetro de referencia la técnica de CIEF, y los sueros controles positivos y negativos señalados en el ítem 1.1. El cálculo de dichos parámetros se realizó mediante el empleo de tablas de contingencia, las que diferencian las muestras en dos categorías, positivo y negativo según el método de “screening”, y establece una comparación respecto al resultado obtenido mediante un método de referencia o confirmatorio (CIEF). El cálculo

matemático de sensibilidad y especificidad se encuentra detallado en el anexo 3 y se realizó según lo establecido por la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Johns Hopkins (Baltimore, Estados Unidos) en su Manual para la Evaluación de Pruebas de Screening Diagnóstico (Kanchanaraksa, 2008).

2.3. Concordancia de 2ME-RSAT con las pruebas de CIEF y ELISA

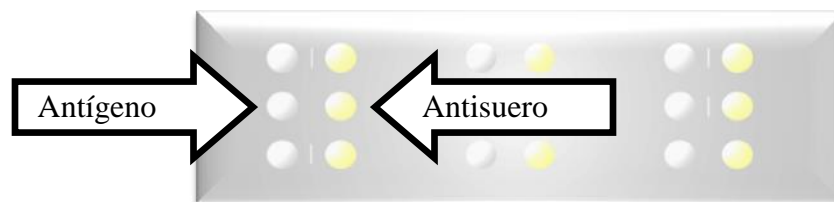
Se aplicó la técnica 2ME-RSAT a 75 sueros, 53 negativos y 22 positivos por CIEF, procesados por el servicio de diagnóstico de LaBFAVET desde el año 2014 hasta noviembre del año 2015. Adicionalmente el 2ME-RSAT se aplicó también a 14 sueros, 7 positivos y 7 negativos por ELISA, provenientes del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del FAVET.

Mediante el empleo del Índice Kappa se calculó la concordancia entre CIEF y 2ME-RSAT y entre ELISA y 2ME-RSAT (Balzarini *et al.*, 2008).

3. Técnica de CIEF.

Se realizó según el protocolo implementado por el LaBFAVET:

1. Preparar suero sanguíneo control positivo en razón 1:1 y antígeno (extracto soluble de *B. ovis*) en razón 1:100, con solución salina tope Sorensen (pH: 7).
2. Preparar pocillos de gel de agarosa: sobre un portaobjetos bañado en agar común se colocan 3 ml de agarosa al 1% en buffer Barbital sódico (pH 8,6). Al enfriarse el gel se realiza la impresión para generar los pocillos que contendrán antígeno y antisueros.
3. Colocar suero sanguíneo y antígeno en pocillos del gel, cuidando que el antígeno quede en el polo negativo y el suero en el polo positivo, como lo demuestra la imagen.



4. Aplicar campo eléctrico a través del gel (< 200 volt y 7,5 mA por cada portaobjeto) durante 2, 5 horas.
5. Leer bajo luz indirecta, previa inmersión en Citrato de Sodio al 5 % por 30 minutos. La presencia de una banda de precipitación indica una muestra positiva.

4. Medidas de bioseguridad

Dado que la memoria se enfocó en la evaluación de una técnica de diagnóstico serológico, sin considerar la manipulación de bacterias vivas, se establecieron medidas de seguridad básicas, dirigidas predominantemente a evitar la contaminación de los sueros y accidentes por elementos corto punzantes, como son los porta objetos y pipetas Pasteur.

4.1 Medidas de seguridad para la manipulación del Beta-Mercaptoetanol concentrado:

Dado que este reactivo es altamente tóxico pudiendo causar la irritación de vías respiratorias al ser inhalado, vómitos y dolor de estómago al ser ingerido y su absorción a través de la piel puede resultar potencialmente fatal, fue necesario adoptar las siguientes medidas de seguridad contenidas en la hoja MSDS (del inglés “Material Safety Data Sheets”):

- Manipular dentro de Gabinete de Bioseguridad.
- Utilizar Guantes, Mangas y Mascarilla para su manipulación.
- Almacenar en contenedor original o equivalente, a temperatura ambiente, sin exposición directa a luz solar.
- Para eliminar este producto concentrado: diluir en agua y eliminar elementos que han tenido contacto con este en contenedores cerrados.

Estas medidas de bioseguridad se establecieron también en relación a los datos R y S incluidos en la hoja de seguridad y detallados a continuación:

Dato R:

- **R23/24/25:** Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
- **R38:** Irrita la piel.
- **R41:** Riesgo de lesiones oculares graves.
- **R43:** Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.
- **R48/22:** Nocivo, riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por ingestión.
- **R50/53:** Muy tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

Dato S:

- **S26:** En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
- **S36/37/39:** Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
- **S45:** En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

RESULTADOS

1. Implementación y determinación de las diluciones de antígeno y antisuero control positivo.

Se implementó la técnica usando el suero control positivo del día 38 post infección (obtenidos de la perra llamada Preciosa). La implementación resultó exitosa, siendo visible la aglutinación tal como se puede observar en la Imagen 1.

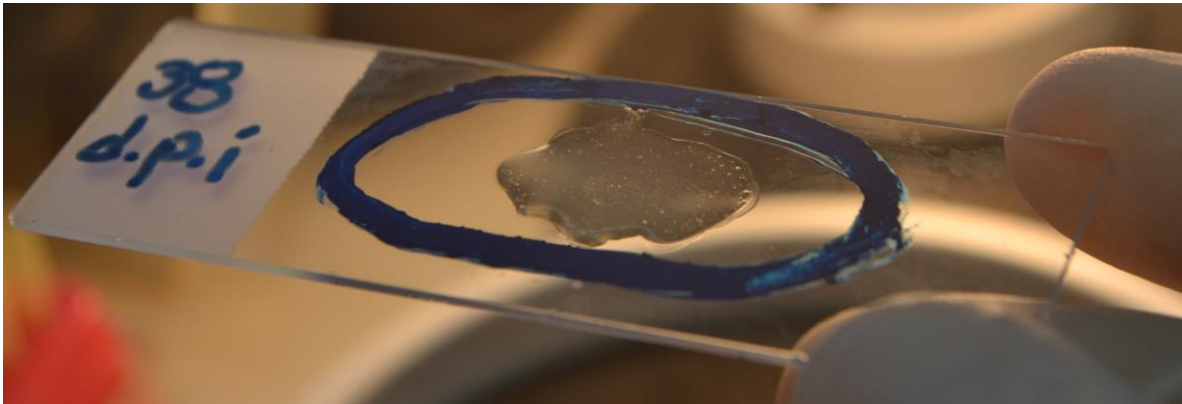


Imagen 1: Fotografía de la reacción de aglutinación con la técnica de 2ME-RSAT con suero de animales experimentalmente infectados y antígeno de *B. canis* inactivada.

La reacción de aglutinación fue nítida utilizando la concentración de 1:100 para el antígeno y de 1:1 para el antisuero control positivo.

2. Determinación de Sensibilidad y Especificidad del 2ME-RSAT.

Se obtuvo la siguiente tabla de contingencia:

Tabla 1: Tabla de contingencia para cálculo de Sensibilidad y Especificidad del 2ME-RSAT para el “screening” diagnóstico de *B. canis*, a partir de sueros controles positivos y negativos, utilizando la técnica de CIEF como referencia.

Resultados "screening" (2ME-RSAT)	Situación real de la Población (CIEF)		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	23	10	33
Negativos	0	29	29
Total	23	39	62

A partir de los datos presentados en la tabla 1 se obtuvo una **sensibilidad de 100%** (1,0) y una **especificidad de 74,3%** (0,743) (Kanchanaraksa, 2008). Además se observó que un 25,6% (10/39) de los sueros correspondían a falsos positivos y no se presentaron falsos negativos. Los valores predictivos fueron: **valor predictivo positivo: 69,6%** (0,696) y **valor predictivo negativo: 100%** (1,0). Se determinó la **concordancia entre CIEF y 2ME-RSAT** para estas muestras controles positivos y negativos, la cual fue de **k = 0,683**, lo que se considera una concordancia buena.

Cabe destacar que los 10 sueros incluidos en la tabla de contingencia, que corresponden a falsos positivos, por cuanto fueron negativos por CIEF pero positivos por el 2ME-RSAT, presentaron una aglutinación menos nítida que los controles positivos. Además, dos de estos sueros se encontraban hemolizados.

Los sueros seronegativos de los días 6 y 12 post infección de las perras inoculadas experimentalmente, aglutinaron pero con menor nitidez que la observada en el resto de los sueros.

3. Determinación de las concordancias entre CIEF y 2ME-RSAT y ELISA y 2ME-RSAT para la seroteca del servicio de diagnóstico de FAVET.

3.1. Concordancia entre CIEF y 2ME-RSAT: El valor del índice kappa para estas dos pruebas fue de $k = 0,489$, lo cual se considera una concordancia moderada (el detalle de los resultados se encuentra en el anexo 4.1).

3.2. Concordancia entre ELISA y 2ME-RSAT: El valor del índice kappa para estas dos pruebas fue de $k = 0,143$, lo cual se considera una concordancia pobre (el detalle de los resultados se encuentra en el en el anexo 4.2)

DISCUSIÓN

El diagnóstico de *B. canis* es sin duda un problema complejo, que mantiene ocupado a numerosos investigadores en diversos lugares del mundo, por cuanto hasta la fecha no existe una única técnica confiable que sirva para ello (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012). Es necesario entonces contar con un método eficaz de “screening” que permita pesquisar esta enfermedad tempranamente e impedir su diseminación tanto a nivel de los criaderos, como después en los hogares de quienes compran los animales.

Es así como a fin de evaluar su potencial como técnica de “screening”, en esta memoria se procedió a implementar la prueba de 2ME-RSAT. Si bien la implementación fue bastante simple de efectuar y se obtuvieron aglutinaciones nítidas y observables a simple vista, en lo que respecta al cálculo de especificidad, el 74,3% obtenido es un tanto bajo si se compara con los valores para el 2ME-RSAT de estudios internacionales. Destaca el 100% obtenido por Wanke *et al.*, el 2012 y por Keid *et al.*, el 2015, ambos estudios realizados con métodos de diagnóstico directo como técnicas de referencia. Otras buenas alternativas de diagnóstico también poseen porcentajes de especificidad mayores como la CIEF que cuenta con un 96,82%, usando como referencia el diagnóstico por AGID (Laserre, 1984) o ELISA que cuenta con un 98,8% en relación al aislamiento bacteriológico (Escobar *et al.*, 2010).

Los resultados falsos positivos (10) detectados en este estudio coinciden con lo descrito en la literatura internacional (Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012). En la que se recomienda el empleo de pruebas confirmatorias a todo animal positivo al 2ME-RSAT, sean estas de diagnóstico directo (PCR, cultivo) o serológicas (AGID, CIEF o ELISA) (Wanke, 2004; Hollet, 2006; Makloski, 2011; CFSPH, 2012). Es interesante señalar, más específicamente en lo que respecta a las características de los 10 sueros falsos positivos, que estos fueron débiles en su aglutinación y dos presentaban hemólisis, lo cual se ha descrito que puede arrojar resultados erróneos al ser sometidos a pruebas de aglutinación (Wanke, 2004).

La elevada sensibilidad obtenida por el 2ME-RSAT (100%), indica que esta técnica tendría una muy buena capacidad para identificar a los animales infectados, al menos hasta el día 266 post infección, que corresponde al día post infección más tardío de los sueros controles

positivos analizados. Lo anterior es importante ya que debido al elevado potencial de contagio de la infección y las consecuencias en criaderos, interesa minimizar la probabilidad que animales positivos pasen como negativos (Kanchanaraksa, 2008; Keid *et al.*, 2009; Keid *et al.*, 2015).

Algo similar le ocurrió a Kauffman *et al.*, el año 2014, cuando de 89 muestras negativas por PCR cuantitativo (qPCR), 15 fueron obtuvieron resultados positivos por el 2ME-RSAT, constituyendo falsos positivos. Pero en el caso de las muestras identificadas como positivas por el qPCR todas estas fueron identificadas como positivas por la técnica de 2ME-RSAT, sin registrarse la ocurrencia de falsos negativos.

Lo planteado en torno a la sensibilidad y especificidad obtenida por el 2ME-RSAT en lo referente a su utilidad como prueba de “screening”, se ve reforzado por los valores predictivos obtenidos. El valor predictivo positivo, es decir la probabilidad de tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es positivo, fue de un 69,6%. De este resultado se deduce que un porcentaje no menor de animales (30,4%), identificados como positivos por la prueba de aglutinación, no se encontrarían infectados según la técnica de referencia, reforzando la necesidad de realizar pruebas confirmatorias a los animales positivos por el 2ME-RSAT.

En cuanto al valor predictivo negativo, la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es negativo, fue de un 100%, indicando que la totalidad de animales identificados como negativos por la prueba de aglutinación, fueron asimismo identificados como tal por la técnica de referencia. Siendo entonces mínima la probabilidad que animales infectados sean considerados como no infectados por el 2ME-RSAT, elemento que como se mencionó anteriormente resulta clave para una prueba de “screening”.

Es importante tener en cuenta que en este estudio la técnica utilizada como parámetro de referencia para obtener la sensibilidad y especificidad fue la técnica de CIEF, la cual no constituye el diagnóstico “gold standard” para *B. canis* y por lo mismo no es el mecanismo

ideal para el cálculo de dichos indicadores. Lamentablemente, dada la falta de propietarios cuyos animales presentaran un cultivo positivo a *B. canis* y que tuviesen la voluntad de participar de esta memoria, fue la técnica que se hallaba disponible. Las poblaciones referenciales entonces, no fueron catalogadas como positivas o negativas por diagnóstico directo como es lo ideal, sino que, por serología lo que puede llevar a sub o sobre estimaciones.

Otro elemento importante de considerar al evaluar el potencial de 2ME-RSAT como “screening” diagnóstico, es la capacidad de detección temprana que mostró al detectar como positivos los sueros de los días 6 y 12 pi, provenientes de perras experimentalmente inoculadas, sueros que fueron detectados como negativos mediante CIEF.

Finalmente, el último elemento a considerar en la evaluación del 2ME-RSAT como mecanismo de “screening” diagnóstico para *B. canis* fue la concordancia, que para ambas técnicas CIEF y ELISA fue baja, aunque mayor para CIEF. Al examinar los resultados individuales que determinaron la concordancia entre 2ME-RSAT y ELISA, se observó que las discordancias se hallan predominantemente en los resultados positivos por la técnica de ELISA. Cuatro de las 7 muestras analizadas fueron identificadas como negativas por el 2ME-RSAT, siendo entonces falsos negativos y constituyendo un grave problema para una prueba que pretende utilizarse como “screening” y que por ende debe minimizar dichos resultados. En cuanto a las muestras negativas por ELISA, solo 2 de las 7 analizadas por 2ME-RSAT fueron identificadas erróneamente como positivas por esta, presentando además reacciones de aglutinación débiles.

En el caso de las discordancias entre la CIEF y el 2ME-RSAT, se encontró la mayor cantidad de incongruencias en los sueros negativos por CIEF, ya que en este caso hubo 10 sueros que contradictoriamente fueron catalogados como positivos por la prueba de aglutinación, todos con reacciones débiles. Pero lo que resulta más preocupante son los 7 casos de sueros positivos por CIEF que no fueron identificados como tal por el 2ME-RSAT.

El hecho que se hayan pesquisado discordancias con respecto al 2ME-RSAT en ambas pruebas, CIEF y ELISA era un resultado esperado, debido a que en estudios anteriores se determinó una alta concordancia entre ambas pruebas (0,961), donde además se determinó que las discordancias se hallaban predominantemente en los sueros negativos (Meza, 2011). Sin embargo, en este caso el problema de mayor importancia se halla en los sueros positivos por CIEF y ELISA que no son identificados como tales por el 2ME-RSAT.

Los resultados obtenidos en el cálculo de concordancia ponen en cuestionamiento la utilidad del 2ME-RSAT como prueba de “screening” diagnóstico, pese a que la literatura revisada (Carmichael y Joubert, 1987; Wanke, 2004; Makloski, 2011; CFSPH, 2012) y los porcentajes de especificidad y sensibilidad obtenidos, sugieren lo contrario. Sin embargo, estos resultados se pueden relacionar con lo planteado por Keid *et al.*, quienes el año 2009 y nuevamente el año 2015, obtuvieron valores muy bajos de sensibilidad para el 2ME-RSAT, usando como técnicas de referencia el diagnóstico directo por PCR y cultivo microbiológico de perros naturalmente infectados. Si bien en estas investigaciones no se trabajó con concordancia, la baja sensibilidad con respecto al diagnóstico directo se le atribuyó al hecho que muchos de los estudios que determinan una buena sensibilidad al 2ME-RSAT están basados en muestras de animales experimentalmente contaminados (Myers *et al.*, 1974; Badaksh *et al.*, 1982). Los autores señalan que las diferencias en cuanto a las sensibilidades obtenidas se pueden deber precisamente a diferencias en el título de anticuerpos (Keid *et al.*, 2009; Keid *et al.*, 2015). En el caso de investigaciones como las de Carmichael y Joubert (1987), quienes reportaron que tanto el RSAT como el 2ME-RSAT tendrían buenas sensibilidades para el diagnóstico de *Brucella canis* en perros naturalmente infectados con cultivo positivo, fueron realizadas utilizando animales bacterémicos, donde el nivel de anticuerpos esperado era elevado.

La presente memoria utilizó sueros de animales experimentalmente infectados y de infección natural sin antecedentes clínicos que sugieran etapa aguda o crónica, lo cual hace suponer que sus títulos de anticuerpos fueron diferentes. Esta baja concordancia podría explicarse en parte debido a que algunas de estas muestras correspondiesen a casos fuera del límite de detección del 2ME-RSAT, pero con títulos pesquisables por CIEF y ELISA.

Lo anteriormente expuesto es de suma importancia para el presente estudio ya que los resultados obtenidos indican una muy buena sensibilidad (100%) cuando se trabajó con muestras provenientes de animales experimentalmente infectados. Además la concordancia entre CIEF y 2ME-RSAT, para las muestras de animales controles positivos (infectados experimentalmente) y controles negativos (sueros negativos por CIEF, provenientes de perros sin sospecha clínica de *B. canis*), fue de 0,683, lo cual se considera buena. Pero al trabajar con muestras provenientes de animales naturalmente infectados, es decir con las muestras de las serotecas de FAVET, la concordancia con las técnicas de ELISA y CIEF fue baja; por lo que el protocolo de 2ME-RSAT utilizado en esta memoria, tendría una mala capacidad diagnóstica en muestras provenientes de animales naturalmente infectados.

Sería ideal entonces, realizar futuras evaluaciones del 2ME-RSAT aumentando el número de muestras y usando como técnicas de referencia mecanismos de diagnóstico directo, como PCR o cultivo bacteriológico. También sería provechoso realizar ensayos de sensibilidad y especificidad con animales naturalmente infectados, y sería especialmente útil conocer, al menos de manera aproximada, los tiempos de infección de estos animales.

CONCLUSIÓN

La prueba de 2ME - RSAT realizada con *B. canis* inactivada fue implementada exitosamente y la implementación fue rápida y fácil aun cuando se necesitaron varias horas de inducción para su observación. Esta técnica presentó además, una elevada sensibilidad y aceptable especificidad comparada con la prueba de CIEF, lo que supone la posibilidad de usarla como “screening”, corroborando todos los animales positivos. En sueros de perros naturalmente infectados se presentaron discordancias con las técnicas de CIEF y ELISA.

BIBLIOGRAFÍA

- BADAKHSH, F. CARMICHAEL, L. DOUGLASS, J.** 1982. Improved Rapid Slide Agglutination Test for Presumptive Diagnosis of Canine Brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 15 (2): 286-289
- BALZARINI, M.G., GONZALEZ, L., TABLADA, M., CASANOVES, F., DI RIENZO, J.A., ROBLEDO, C.W.** 2008. *Infostat Software Estadístico. Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina. 336p.
- 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.* 2 (2): 219-220.
- BORIE, C.; CEPEDA, R.; VILLARROEL, M.; DE LOS REYES, M.** 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Arch. Med. Vet.* (34).
- BORIE, C.; PINOCHET, L.** 1987. Brucelosis canina: Conceptos generales y estudios realizados en el país. *Mongr. Cs. Vet.* 9 (2).
- CARMICHAEL, LE.; JOUBERT, JC.** 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella Canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet.* 77: 3-12.
- CASTILLO, D.; VALENZUELA, C.** 2002. Métodos Inmunoquímicos. **In:** *Fundamentos de Inmunología*. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. pp 637-652.
- CFSPH. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH.** 2012. Canine Brucellosis: *Brucella canis*, Contagious Abortion, Undulant Fever [en línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf> [fecha consulta: 26-03-2015]

CFSPH. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. 2009. Brucellosis: Undulant Fever, Malta Fever, Mediterranean Fever, Enzootic Abortion, Epizootic Abortion, Contagious Abortion, Bang's Disease. [en línea] <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>> [fecha consulta: 26-03-2015]

MINSAL, MINISTERIO DE SALUD CHILE. 2010. El Control de las Poblaciones Caninas en los Centros Urbanos, Una Visión de Salud Pública [en línea] <http://www.munitel.cl/eventos/seminarios/html/documentos/2010/SEMINARIO_POSTURA_MUNICIPAL_POR_ANIMALES_POTENCIALMENTE_PELIGROSOS/PPT07.pdf> [fecha consulta: 24-04-2016]

ESCOBAR, G.; BOERI, E.; AYALA, S.; LUCERO, N. 2010. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. Rev. Arg. Microbiol. 42: 35-40

GÓMEZ, V. 2007. Seroprevalencia de Brucelosis Canina Por *B. Canis* en Clínicas Veterinarias del Gran Santiago 2002 – 2003. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Depto. de Medicina Preventiva Animal. 52p

GREENE CE. 2000. Enfermedades infecciosas en perros y gato. 2ª ed. Editorial: McGraw-Hill/ Interamericana de México. México. 810p

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.

HOLLET, B. 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. Theriogenology. 66: 575–587

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

IBARRA, L.; NÚÑEZ, F.; ADASME, M. 2006. Agresividad Canina y Acciones del Médico Veterinario en su Prevención. Av. Cs. Vet. 21:3-7.

KANCHANARAKSA, S. 2008. Evaluation of Diagnostic and Screening Tests: Validity and Reliability. [en línea]. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Johns Hopkins University. <<http://ocw.jhsph.edu/courses/fundepi/pdfs/lecture11.pdf>> [fecha consulta: 30-06-2015]

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

KAUFFMAN, 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, LB.; DINIZ, JA.; OLIVEIRA, TM.; FERREIRA, HL.; SOARES, RM. 2015. Evaluation of an Immunochromatographic Test to the Diagnosis of Canine Brucellosis Caused by *Brucella canis*. Reprod. Domest. Anim. 50(6):939-44.

KEID, L.; SOARES, R.; SALGADO, V.; VASCONCELLOS, S.; RICHTZENHAIN, L.; MEGID, J. 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.

LASSERRE, M. 1984. Brucelosis canina: diagnostico comparativo entre doble difusión en agar y contrainmunolectroforesis. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias veterinarias y Pecuarias. U. Chile. 40 p.

LEPE, N. 2014. La impresionante cifra de los "Perros de la Calle" en Chile. [en línea]. Terra Noticias. 4 Agosto 2014. <<https://noticias.terra.cl/chile/la-impresionante-cifra-de-los-perros-de-la-calle-en-chile,6a6ace8f09397410VgnVCM10000098cceb0aRCRD.html>> [fecha consulta: 24-04-2015]

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. 2008. Manual de Procedimientos: Técnicas para el Diagnóstico de Brucelosis Humana. [en línea] http://bvs.panalimentos.org/local/File/manual_procedimientos_brucelosis_2008.pdf [fecha consulta: 10-03-2016]

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

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

MEZA, M.I. 2011. Memoria de Título. Desarrollo de un ELISA Indirecto con Antígeno LPS-R de *Brucella Abortus* Cepa RB51, para el Diagnóstico Serológico de Brucelosis Canina. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

MYERS, D; VARELA-DIAZ, V.; COLTORTI, E. 1974. Comparative Sensitivity of Gel-Diffusion and Tube Agglutination Tests for the Detection of *Brucella canis* Antibodies in Experimentally Infected Dogs. *J. Appl. Microbiol.* 28: 1-4.

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

PEI, J.; WU, Q.; KAHL-MCDONAGH, M.; FICHT, T. 2008. Cytotoxicity in Macrophages Infected with Rough *Brucella* Mutants Is Type IV Secretion System Dependent. *Infect. Immun.* 76: 30–37

POLLOCK, R.V. 1979. Canine brucellosis: current status. *Comp. Cont. Ed. Small. Anim. Pract.* 1: 255-267.

SEIMC. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. 2009. Procedimientos en Microbiología Clínica. Capítulo 19 Técnicas Rápidas de Obtención de Antígeno. [en línea] <<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf>>[fecha consulta: 10- 01-2016]

SILVA, I. 2016. Memoria de Título. 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. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 28p.

SOTOMAYOR, M. 2001. Memoria de Título. Diagnóstico de Brucelosis Canina: Utilización de un Antígeno Proteico Citosólico de *Brucella Abortus* cepa RB51 en Perros

Infectados Experimentalmente. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

TALUKDER, B.; SAMAD, M.; RAHMAN, A. 2011. Comparative Evaluation of Commercial Serodiagnostic Tests for the Seroprevalence Study of Brucellosis in Stray Dogs in Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.* 9(1): 79 - 83.

TUEMMERS, C.; LÜDERS, C.; ROJAS, C.; SERRI, M.; CASTILLO C.; ESPINOZA, R. 2013. Detección de *Brucella canis* por Método de Inmunocromatografía en Perros Vagos Capturados en la Ciudad de Temuco, Chile, 2011. *Rev. Chil. Infectol.* 30: 395 - 401.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2015. Best Practices for *Brucella canis* Prevention and Control in Dog Breeding Facilities. [en línea] https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/brucella_canis_prevention.pdf [fecha consulta: 11- 01-2016]

VALENZUELA, N.; GARCÍA, P.; SALGADO, S.; CONCHA, M.; ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; BORIE, C. 2005. Seroprevalencia en humanos de *Brucella canis* en un grupo con exposición ocupacional. XXII Congreso Chileno Infectología. Octubre. CO37.

VRMD. VETERINARY MEDICAL REASERCH AND DEVELOPMENT. 1995. IFA Test for Canine Brucellosis. [en línea] <<https://www.vmr.com/technical-library/detail/ifa-test-for-canine-brucellosis>> [fecha consulta: 02-12-2015]

VILLARROEL, M. 1998. Diagnóstico Serológico de Brucelosis Canina Mediante Contrainmunolectroforesis utilizando extracto Citosólico de *Brucella abortus* Cepa RB51. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Depto. de Medicina Preventiva Animal. 73p

WANKE, M.; CAIRO, F.; ROSSANO, M.; LAIÑO, M.; BALDI, PC.; MONACHESI, EA.; COMERCIO, EA.; VIVOT, MM. 2012. Preliminary Study of an

Immunochromatography Test for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (6): 370–372.

WANKE, M. 2004. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 195-207

WANKE, M.; CAIRO, F.; ROSSANO, M.; LAIN, M; BALDI, PC.; MONACHESI, NE.; COMERCIO, EA.; VIVOT, M. 2012. Preliminary Study of an Immunochromatography Test for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (6): 370–372.

ANEXO 1:

1.1 Valores referenciales de distintas técnicas de diagnóstico serológico de *Brucella canis* en Chile: (Los laboratorios consultados son confidenciales)

Técnica de Diagnóstico	Costo (en pesos chilenos)
PCR	\$26.000
TAT	\$15.500
ELISA	\$15.000
CIEF	\$15.000
CULTIVO	\$15.000

(Tabla de elaboración propia en base a los datos recolectados, septiembre 2015)

1.2 Valores referenciales del costo de diagnóstico por 2ME-RSAT en Argentina

Laboratorio	Costo 2ME-RSAT (en pesos chilenos)
Laboratorio del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria	\$400 ¹
Laboratorio I (privado)	\$3.700
Laboratorio II (privado)	\$8.900

(Tabla de elaboración propia en base a los datos recolectados, septiembre 2015)

(Los valores fueron calculados con un cambio de: 1 CLP = 0.01833 ARS)

¹ Valores Servicio de diagnóstico del Laboratorio del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria:

http://www.senasa.gov.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/LABORATORIO/A.5.ANEXO_ARANCELES%20SERV%20LABORATORIO.pdf

ANEXO 2:

Esquemas para el cálculo de las máximas diluciones de antígeno y antisuero control positivo para lograr una aglutinación visible.

Esquema 1:

Antígeno Variable	Antisuero Fijo
1	1
1:1	1
1:10	1
1:100	1
1:1000	1

Esquema 2:

Antígeno Fijo	Antisuero Variable
X*	1:1
X	1:2
X	1:3
X	1:4
X	1:5

*X representa la dilución del antígeno que logre la mejor aglutinación.

ANEXO 3:

Modelo explicativo de empleo de Tablas de Contingencia para el cálculo de sensibilidad y especificidad, adaptado de Kanchanaraksa (2008).

Resultados “screening”	Situación real de la Población		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	x		
Negativos		z	
Total	y	w	

Sensibilidad: $x \div y$

Especificidad: $z \div w$

Ambos resultados se expresarán en porcentaje.

ANEXO 4:

Resultados individuales obtenidos a partir de las Serotecas del Laboratorio de Bacteriología y Laboratorio de Enfermedades Infecciosas

4.1 Resultados de las Muestras de la Seroteca del LaBFAVET:

Muestra	Resultado CIEF	Resultado 2ME-RSAT	Muestra	Resultado CIEF	Resultado 2ME-RSAT
1	+	+	17	+	-
2	+	+	18	+	+
3	+	+	19	+	-
4	+	+	20	+	+
5	+	-	21	+	-
6	+	+	22	+	+
7	+	+	1b	-	-
8	+	+	2b	-	-
9	+	-	3b	-	-
10	+	-	4b	-	-
11	+	+	5b	-	-
12	+	+	6b	-	-
13	+	+	7b	-	-
14	+	+	8b	-	-
15	+	-	9b	-	+
16	+	+	10b	-	+
11b	-	-	33b	-	-

12b	-	-	34b	-	-
13b	-	+	35b	-	-
14b	-	+	36b	-	-
15b	-	+	37b	-	-
16b	-	+	38b	-	-
17b	-	-	39b	-	-
18b	-	-	40b	-	-
19b	-	-	41b	-	-
20b	-	-	42b	-	-
21b	-	-	43b	-	-
22b	-	-	44b	-	-
23b	-	+	45b	-	-
24b	-	+	46b	-	-
25b	-	-	47b	-	-
26b	-	-	48b	-	-
27b	-	-	49b	-	-
28b	-	-	50b	-	-
29b	-	-	51b	-	-
30b	-	-	52b	-	-
31b	-	+	53b	-	-
32b	-	+			

4.2 Resultados de las Muestras de la Seroteca del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET:

Muestra	Resultado ELISA	Resultado 2ME-RSAT
1e	+	+
2e	+	-
3e	+	+
4e	+	-
5e	+	+
6e	+	-
7e	+	-
8e	-	-
9e	-	+
10e	-	-
11e	-	+
12e	-	-
13e	-	-
14e	-	-