



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título
de DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

“Estudio de la variabilidad genética de *Brucella melitensis* en el noroeste de la Provincia de San Luis”

AUTOR: ARREGUI, Matias Ezequiel

Director: Dr. SAMARTINO, Luis Ernesto

Co-Director: Dr. MARTINO, Pablo Eduardo

Lugar de trabajo: INSTITUTO DE PATOBIOLOGÍA, CICVyA, INTA Castelar

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. SPÄTH, Ernesto

Dra. FIORENTINO, María Andrea

Dra. MOREDO, Fabiana

2020

A Johana, mi perfecta compañera de la vida

A Salvador, nuestro hijo

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé que tanta gente iba a participar e influir en mayor o menor medida en la realización del presente trabajo. Resulta una tarea imposible intentar recopilar (y no olvidar) a todas las personas que me gustaría agradecer por haber dado una mano en forma directa en los ensayos o en forma indirecta, cebando un mate, brindando palabras de apoyo, o fomentando un momento de distracción.

Quiero agradecer inicialmente a Luis, mi director, por haberme dado la llave del laboratorio y la libertad de trabajar sin restricciones. La oportunidad que me brindó, el apoyo y su conocimiento fueron fundamentales para lograr los objetivos para el presente trabajo.

A mi codirector, Pablo, por haberme acompañado con críticas y correcciones desde el plan de trabajo hasta la versión final del trabajo de tesis. Sus correcciones siempre fueron con el fin de que yo pueda aprender de mis equivocaciones.

A todo el plantel de trabajadores del Ministerio del Campo de la Provincia de San Luis, en particular a Gabriela por ser nuestro contacto, permitir el trabajo en conjunto y darme el acceso a las tan valiosas muestras.

Al enorme personal del Instituto de Patobiología por aportar entre todos al trabajo día a día. Especialmente quiero agradecer a Nati, Nacho, Cris y Manuel, por su invaluable ayuda y los grandes momentos que permitieron que el trabajo sea más fácil de realizar.

A mis grandes amigos del IP: Dani, La Peque, Juan, Charle, Marianito y Carla, por la innumerable cantidad de momentos compartidos. Por todas la juntadas, toda la ayuda y todos los consejos. Gracias.

A Morena, mi gata, que estuvo en muchos momentos acompañándome.

A mis amigos de la vida Juli y Mati, los conocí hace mucho tiempo y acompañaron mi crecimiento personal y profesional. Gracias por estar siempre.

A mi hermosa familia que siempre me apoyó y fomentó en cada decisión, que siempre estuvo a mi lado, que me llenó de cariño en cada momento. Todas las metas que alcancé en mi vida fueron gracias a ustedes.

A Johana y Salvador: los amores de mi vida. No tengo la capacidad de expresar por escrito todos los sentimientos que me genera pensar en ustedes. No puedo imaginar una vida sin estar a su lado, los amo.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES RELACIONADAS AL TRABAJO DE TESIS

Arregui, M., Delgado, M., Navarro, M., Rodríguez, M., Samartino, L. "Tipificación Bacteriológica y Bioquímica de Aislamientos de *Brucella melitensis* Provenientes de la Provincia de San Luis" Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios Diagnósticos. San Salvador de Jujuy, 2016

Delgado, M., Arregui, M., Navarro, M., Spina, M., Rey, J., Garro, C., Rodríguez, M., Samartino, L. "Descripción de un brote de brucelosis caprina, a partir de un brote en humanos" Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios Diagnósticos. San Salvador de Jujuy, 2016

Arregui, M., Samartino, L. "Identificación Y Genotipificación Mediante MLVA 16 De *Brucella melitensis* a partir de tejidos inoculados y proveniente de animales naturalmente infectados". II Congreso Argentino de Zoonosis y IX Congreso Internacional de Zoonosis. 5 al 7 junio 2018. Buenos Aires, Argentina

Arregui, M., Samartino, L. "MLVA 16 Para La Genotipificación De *Brucella melitensis* A Partir De Tejidos Caprinos Y Ovinos Provenientes De La Provincia De San Luis". XXII Reunión Científico Técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio Diagnóstico. 15-17 de noviembre 2018. Rio Cuarto, Córdoba, Argentina.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	0
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	3
RESUMEN	6
TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS	7
RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Antecedentes históricos de la enfermedad	8
1.2. Brucelosis en el mundo.....	9
1.2.1. Brucelosis en América Latina	10
1.2.2. Brucelosis caprina en Argentina	11
1.3. Provincia de San Luis	12
1.4. Brucelosis en humanos.....	15
1.5. <i>Brucella melitensis</i> en sus hospedadores de preferencia.....	17
1.6. Agente Etiológico	19
1.6.1. Características del género <i>Brucella</i>	19
1.6.2. Características genéticas de <i>Brucella</i> spp.	24
1.7. Análisis multilocus del número variable de repeticiones en tándem para el estudio de la diversidad genética de <i>B. melitensis</i>	25
1.8. Patogenia de la enfermedad.....	27
1.8.1. La respuesta inmune a la infección con <i>Brucella</i>	30
1.8.2. Participación de la Inmunidad innata en infecciones con <i>Brucella</i> spp.....	30
1.8.3. Participación de la inmunidad adaptativa en la respuesta ante <i>Brucella</i> spp.	32
1.9. Diagnóstico de brucelosis.....	34
1.9.1. Métodos diagnósticos serológicos.....	34
1.9.2. Diagnóstico bacteriológico de <i>Brucella</i> spp.	36
1.9.3. Diagnóstico molecular de <i>Brucella</i> spp.	37
1.10. Objetivos	39

1.10.1 Objetivo general.....	39
1.10.2. Objetivos particulares	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.1. Zona de estudio, establecimientos muestreados y animales afectados al estudio	40
2.2. Pruebas de diagnóstico serológico.....	41
2.2.1. Análisis estadístico de las pruebas serológicas.....	42
2.2.2. Prueba de antígeno tamponado en placa.....	43
2.2.3. Ensayo de polarización fluorescente	44
2.2.4. Fijación del complemento.....	45
2.3. Bacteriología.....	47
2.3.1. Muestras de tejidos.....	48
2.3.2. Obtención de aislamiento de <i>Brucella</i> spp.	49
2.4. Tipificación molecular de <i>B. melitensis</i>	50
2.4.1. Métodos de extracción y purificación de ADN	50
2.4.2. Tipificación molecular de <i>Brucella melitensis</i>	53
2.4.3. Subtipificación molecular mediante MLVA 16.....	54
2.4.4. Análisis del poder discriminatorio y de la relación genética	56
2.4.5. Comparación de los genotipos descritos con bases de datos cooperativas	57
3. RESULTADOS	58
3.1. Identificación serológica de animales infectados	58
3.1.1. Análisis comparativo de las pruebas serológicas.....	58
3.2. Aislamientos obtenidos de <i>Brucella melitensis</i>	59
3.3. Elección y estandarización del método de extracción de ADN de tejidos y desempeño de PCR.....	62
3.4. Detección molecular de <i>Brucella melitensis</i>	64
3.5. Diversidad de los marcadores VNTR analizados mediante MLVA 16 sobre ADN de proveniente de aislamientos de <i>B. melitensis</i>.....	67
3.6. Genotipos circulantes de <i>B. melitensis</i>.....	68
3.7. Análisis de la relación genética de <i>B. melitensis</i> aisladas de la Provincia de San Luis...70	70
3.8. Comparación de los genotipos circulantes con los presentes en bases de datos internacionales.....	75

4. DISCUSIÓN.....	78
5. CONCLUSIONES	89
6. BIBLIOGRAFÍA.....	90
ANEXO I.....	104
Preparación y estandarización de reactivos para la ejecución del ensayo de Fijación de Complemento.....	104
Ejecución de la titulación cruzada en microplaca del complemento y la hemolisina	109
ANEXO II	113
Tabla de conversión para estimar el número de repeticiones en tándem en función del tamaño del producto amplificado mediante PCR.....	113

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C: grado centígrado

µm: micra

2ME: prueba de 2 mercaptoethanol

A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag: solución de antígeno

AME: grupo América

BCV: vacuolas contenedoras de *Brucella*

Bk: fago Berkeley

BPA: prueba de antígeno tamponado en placa

bv1: biovar 1

BvrR/BvrS: sistema de 2 componentes

BVS: buffer veronal sódico

C: citosina

C': solución de Complemento

CLU: cluster

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CO₂: dióxido de carbono

CPAs: células presentadoras de antígenos

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMG: grupo Mediterráneo oriental

FC: fijación del complemento

Fi: fago Firenze

FICT: isotiocianato de fluoresceína

FPA: ensayo de polarización fluorescente

G: guanina

GC: guanina-citosina

goeBURST: método óptimo global basado en tipos de secuencia relacionados

H': solución de hemolisina

Has.: hectáreas

HOOF-Prints: huella dactilar por oligonucleótidos octaméricos hipervariables

IDGH: índice de diversidad de Hunter-Gaston

IFN- γ : interferón gamma

IgG1: inmunoglobulina isotipo G1

ILs: interleuquinas

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IS: secuencia de inserción

IU: unidades internacionales

l: litro

Lnn: linfonódulos

Mb: megabases

LPS: lipopolisacárido

MdCdIPdSL: Ministerio del Campo de la Provincia de San Luis

mg: miligramo

MLVA: análisis multilocus del número variable de repeticiones en tándem

mP: unidades de milipolarización

NK: natural killer

O: antígeno somático

Omps: proteínas de la membrana externa

PA: poder anticomplementario

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

pb: Pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMN: polimorfonucleares

QS: detección de quorum

RB51: cepa mutante vacunal lisa de *B. abortus*

Rev. 1: cepa mutante vacunal estreptomycin dependiente de *B. melitensis*

R-LPS: Lipopolisacárido rugoso

SAT: seroaglutinación en tubo

SDS: dodecilsulfato sódico

Se: sensibilidad

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SH₂: ácido sulfhídrico

S-LPS: lipopolisacárido liso

Sp: especificidad

spp.: especies

T: timina

T4SS: sistema de secreción tipo 4

Tb: fago Tbilisi

TE: TRIS EDTA

TLRs: receptores tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TRs: repeticiones en tándem

TRIS-HCl: trisaminometano ácido clorhídrico

UFC: unidad formadora de colonia

UH: unidades hemolíticas

UIFC: unidades internacionales fijadoras de complemento

UPGMA: método de agrupamiento de pares no ponderados con la media aritmética

UV: ultra violeta

V-DICE: extractor de diversidad y confianza de VNTR

VirB: operón codificante de T4SS

VN: verdaderos negativos

VNTR: secuencias repetidas en tándem de número variable

VP: verdaderos positivos

wboA: gen implicado en la síntesis de LPS

We: fago Weybridge

WMG: grupo Mediterráneo occidental

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el análisis de la variabilidad genética de *Brucella melitensis* en los departamentos de Libertador General San Martín, Ayacucho y Belgrano pertenecientes a la Provincia de San Luis. Con este propósito se identificaron rodeos con diferentes valores de prevalencia de brucelosis mediante técnicas serológicas. A partir de su identificación se procesaron tejidos caprinos y ovinos para obtener aislamientos en pureza de *B. melitensis* y a su vez, mediante diferentes métodos de extracción de ADN y PCR se evidenció la presencia del patógeno en tejidos. Se empleó el esquema MLVA 16, que utiliza la variabilidad de 16 marcadores moleculares para generar una individualización inequívoca de los genomas de *B. melitensis* provenientes de distintos animales. Los genotipos se analizaron para determinar la relación filogenética entre ellos y se sumaron los datos de georreferenciación de los mismo para tener una información completa sobre la presencia y circulación de distintos genotipos en cada departamento. Este estudio permitió identificar 21 genotipos circulante en los departamentos productores caprinos de la Provincia de San Luis. Inclusive el modelo de relación filogenética encontró algunos de los genotipos descritos como potenciales candidatos a fundadores del linaje que se encuentra distribuido en diferentes áreas de la Provincia. Se confirmó la capacidad discriminatoria de la técnica en una situación epidemiológica real, inclusive discriminando genotipos dentro de una misma localización de muestreo. Los genotipos del presente trabajo no se encontraron descritos en bases de datos internacionales.

PALABRAS CLAVE: *Brucella melitensis*, subtipificación molecular, VNTR, San Luis

TÍTULO EN IDIOMA INGLÉS

Study of the genetic variability of *Brucella melitensis* in the northwest of the province of San Luis

RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS

The objective of this work was the analysis of the genetic variability of *Brucella melitensis* in the departments of Libertador General San Martín, Ayacucho and Belgrano that belong to the province of San Luis. For this purpose, rodeos with different prevalence values of brucellosis were identified by serological techniques. Goat and sheep tissues were processed to obtain isolates of *B. melitensis* and also, the presence of the pathogen in tissues samples was evidenced by different DNA and PCR extraction methods. The MLVA 16 scheme was used, which uses the variability of 16 molecular markers to generate an unequivocal individualization of the genomes of *B. melitensis* from different animals. The genotypes were analyzed to determine the phylogenetic relationship between them and their georeferenced data were added to have complete information on the presence and circulation of different genotypes in each department. This study allowed to identify 21 circulating genotypes in the goats. Even the phylogenetic relationship model found some of the genotypes described as potential candidates for founders of the lineage that is distributed in different areas of the province. The discriminatory ability of the technique in a real epidemiological situation was confirmed, including discriminating genotypes within the same herd, even working with DNA from both isolates and total DNA from tissues from infected animals. The genotypes from this work were no previously described in any international data base.

KEYWORDS: *Brucella melitensis*, molecular genotyping, VNTR, San Luis

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos de la enfermedad

En 1886, el cirujano británico Cap. David Bruce, su mujer Mary Elizabeth Steele y el microbiólogo maltés Dr. Giuseppe Caruana Scicluna obtuvieron e identificaron por primera vez un aislamiento de *Brucella melitensis* (denominado en un primer momento como *Micrococcus melitensis*) a partir del bazo de un militar. Ésta fue la primera especie conocida del género *Brucella*. Un año más tarde, el médico maltés Fioravanti Temistocle Archimede Laurenzo Giuseppe Sammut, mejor conocido como “Temi Zammit”, encontró que el agente causal de la “Fiebre de Malta”, “Fiebre Mediterránea”, “Fiebre de Chipre”, “Fiebre Napolitana”, “Fiebre de Gibraltar”, “Fiebre de Crimea”, “Fiebre de Cartagena”, “Fiebre de Barcelona”, “Fiebre de los soldados”, “Fiebre ondulante” (sólo por mencionar algunas denominaciones de la enfermedad) eran transmitidas por cabras infectadas a los humanos, principalmente a través de leche contaminada demostrando la capacidad del microorganismo de diseminarse a diferentes órganos de un individuo y producir la enfermedad. Los nuevos avances llevaron a la prohibición del consumo de leche cruda, logrando una consecuente disminución del número de personas enfermas (Wyatt, 2009). En 1897 Wright y Semple describieron los primeros estudios serológicos para identificar individuos infectados por *Micrococcus melitensis*. En el mismo año, el científico danés Bernhard Bang describió la presencia de microorganismos que nombró *Bacillus abortus* (denominado posteriormente *Brucella abortus*) asociado a fetos abortados de bovino. En 1914, Traum reportó el aislamiento de otro microorganismo con similares características a *M. melitensis* (luego *Brucella suis*) en fetos abortados de cerdos en Estados Unidos. Pero finalmente, la asociación entre estas

bacterias zoonóticas fue descrita en 1918 por Alice Catherine Evans, microbióloga estadounidense, cuyos descubrimientos ayudaron a entender la epidemiología de la brucelosis y contribuyeron al entendimiento acerca de la pasteurización como método preventivo de esta enfermedad.

En 1920, Louis Meyer y Wilbur Shaw, en reconocimiento a David Bruce, propusieron que este grupo de bacterias patógenas fuera reunido bajo un mismo género llamo *Brucella* (Moreno, 2014).

1.2. Brucelosis en el mundo

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la brucelosis como una de las 7 principales enfermedades endémicas zoonóticas desatendidas (Pérez-Sancho y col., 2015). Dadas sus características, contribuye de manera importante en el desarrollo socio-económico de los estratos poblacionales más vulnerables y la perpetuación de su condición en países en vías de desarrollo. A pesar de que la mayoría de los países desarrollados se encuentran libres de esta enfermedad, la brucelosis posee una extensa distribución, principalmente en la región Mediterránea, Medio Oriente, Asia Central, y América Latina logrando, de esta manera, ser un problema a nivel global. Hasta el 2017, sólo 18 países habían sido declarados oficialmente libres de brucelosis en bovinos, ovinos y caprinos (Zhang y col., 2018). Programas de vacunación apoyados por los gobiernos, sumados a programas de detección y eliminación de animales enfermos, han prácticamente erradicado o disminuido drásticamente los casos de brucelosis en países industrializados. Sin embargo, en los últimos años, en algunos países como Francia y Bélgica, la brucelosis aparece como una enfermedad reemergente (Castaño y col., 2017).

Cerca de medio millón de nuevos casos son diagnosticados en humanos todos los años alrededor del mundo, donde los responsables principales de su diseminación son los animales (y los productos derivados de ellos) (Pappas y col., 2006).

Brucella melitensis (la principal especie asociada a brucelosis en pequeños rumiantes) es el agente etiológico más prevalente de brucelosis en el humano en la mayor parte del mundo (Doganay y Aygen, 2003; Khan y Zahoor, 2018). En lo que respecta a producción animal, la enfermedad tiene un gran impacto económico, no sólo por sus consecuencias directas (eliminación de animales, reemplazo de reproductores) sino también por las pérdidas indirectas que genera (restricciones en el comercio) (Franc y col., 2018).

El problema de la brucelosis debe ser considerado como un claro ejemplo de la necesidad de estrategias “un mundo, una salud” (*One World, One Health*) (van Helden y col., 2013) y comprender que la prevención de la brucelosis en humanos es imposible de lograr sin un correcto control de la enfermedad en los animales.

1.2.1. Brucelosis en América Latina

La brucelosis se conoce en América Latina desde principios del siglo XX. Es considerada una de las infecciones zoonóticas más importantes por el impacto sobre la salud pública y la economía (Baumgarten, 2002; Poester y col., 2002; Vargas, 2002; Martinez, 2013; Guzmán-hernández y col., 2016). Su distribución se encuentra fuertemente relacionada a regiones con alta concentración de ganado. La población animal en la región está representada principalmente por ganado bovino, seguido por ovinos, caprinos y porcinos.

Algunas de las posibles razones por las cuales la enfermedad tiende a permanecer en América Latina se podrían explicar por las prácticas de cría de distintas especies de animales

compartiendo pasturas y abrevaderos, la interacción del medio rural con el urbano para adquirir insumos, la comercialización de productos, la faena de animales y sus múltiples derivados preparados artesanalmente carentes de control sanitario (Franc y col., 2018).

Si bien ha sido erradicada en muchos países industrializados, continúa siendo un grave problema para la salud pública, la producción animal y la economía ganadera. Argentina se encuentra junto con Perú y México entre los países con prevalencias más elevadas de casos de brucelosis humana dentro de América Latina (Lucero y col., 2007; Méndez-Lozano y col., 2015; Franc y col., 2018)

El mayor número de casos se encuentra asociado a personas que se desempeñan trabajando con animales o frecuentan granjas. A pesar de ser una enfermedad endémica, en muchos países en desarrollo se encuentra sub-diagnosticada, e inclusive muchas veces no es reportada en forma oficial (Godfroid y col., 2005; Epidemiología, 2013).

1.2.2. Brucelosis caprina en Argentina

En Argentina se dispone de información sobre la presencia de brucelosis específicamente en caprinos y humanos desde el año 1922 con reportes en la Provincia de Córdoba (Robles y col., 2014). En los llanos de La Rioja fue descrita en 1941 y en Mendoza, Córdoba y Chaco semiárido en décadas posteriores (Cruz y col., 2002). La información disponible de distintas fuentes muestra que la distribución de la infección por *B. melitensis* en caprinos en el país no es homogénea, presentándose regiones de alta prevalencia, otras de media y baja (Robles y col., 2014) y otras aparentemente libres (también existen regiones sobre las que no existen datos) (González Tomé y col., 1995). En general, las regiones de alta prevalencia coinciden con registros sobre la ocurrencia histórica de casos de brucelosis en humanos (Wallach y col., 1998).

1.3. Provincia de San Luis

La Provincia de San Luis, ubicada en el centro oeste de la Argentina, posee una superficie de 7.674.800 has., donde más del 70% es destinada a la producción pecuaria, posicionándose la actividad de cría caprina como una de las principales explotaciones ganaderas de la Provincia (Rodríguez y Delgado, 2016).

La producción caprina provincial posee características regionales similares a las restantes provincias cuyanas, con las cuales comparte modelos productivos, áreas geográficas, aspectos culturales y sanitarios. La presencia de enfermedades zoonóticas es también común e histórica (Goobar y col., 1975). La cría para la subsistencia familiar es la predominante y corresponde a pequeños y medianos productores, existiendo pocos emprendimientos a mayor escala (Robles y col., 2014). La convivencia de la familia rural con el ganado caprino y su estrecho contacto, definen la importancia de las enfermedades zoonóticas en el abordaje de políticas sanitarias y planes de control.

1.3.1. Producción caprina en la Provincia de San Luis

En San Luis, la explotación caprina comprende a productores (normalmente núcleo familiar) con muy poco desarrollo, basada fundamentalmente en los escasos recursos económicos e infraestructura. La realidad es compartida con varias provincias vecinas, sumado a características climáticas y geográficas similares, llevando a explotaciones de igual descripción e igualdad de condiciones (Rodríguez y Delgado, 2016). El límite político de las provincias de la Región de Cuyo (San Luis, San Juan, Mendoza y La Rioja) es prácticamente un límite virtual, tal como se observa en regiones áridas/semiáridas y con un contexto epidemiológico similar (Robles y col., 2014).

Los principales departamentos productores de ganado caprino de la provincia son los ubicados en el noroeste: Belgrano, Ayacucho y General San Martín. Entre los tres acumulan una población de 27.540 habitantes, radicada fundamentalmente en la zona rural (Rodríguez y Delgado, 2016).

Respecto a la población animal, el ganado caprino ocupa el segundo lugar a nivel provincial, concentrado en los mencionados departamentos, ascendiendo a cubrir 2/3 de la población caprina provincial (SENASA, 2017). La mayoría corresponden a majadas pequeñas compuestas por razas criollas con mezcla de Anglo-Nubian y Saanen, para la producción mixta de carne y leche, que conforman unidades productivas destinadas al autoconsumo y frecuentemente constituyen la dieta exclusiva de los habitantes de la zona.

Muy pocos productores poseen majadas cerradas con reposición propia. La mayoría realiza la compra no segura de reproductores y la venta en el establecimiento de animales que son trasladados para faena por trabajadores cuya función es concentrar y transportar las crías (informalmente conocidos como "chiveros"). Otra práctica común es el préstamo de reproductores, como así también el intercambio de los mismos y se observa como una característica productiva el pastoreo comunitario.

Es esperable que la brucelosis impacte negativamente en la producción animal, ocasionando mermas económicas por pérdidas productivas y reproductivas, a causa de abortos en la cabras y disminución de la producción de leche. Los valores de reventa se ven afectados, perjudicando e impidiendo la comercialización de productos y subproductos (Acha y Szyfres, 2005).

No obstante, la principal preocupación radica en la capacidad zoonótica de la enfermedad, teniendo en cuenta el riesgo sobre la familia rural, la venta de derivados lácteos para consumo humano y la falta de bioseguridad de las plantas de faena. Los aspectos culturales y tradicionales vuelven vulnerable al productor caprino. Los corrales de encierre usualmente se encuentran cercanos a la vivienda familiar, y generan un ambiente altamente contaminado. Las prácticas diarias con el ganado se realizan en un entorno familiar, siendo las mujeres y los niños quienes comúnmente suelen realizar el manejo de las cabras en los corrales, exponiéndose fácilmente a contraer la enfermedad.

1.3.2. Brucelosis caprina en la provincia de San Luis

El primer antecedente de prevalencia en la provincia data de 1976 cuando la Dirección de Ganadería del Gobierno de San Luis realizó un muestreo en el cual detectó un 3.5% de hatos con animales positivos a la prueba de Huddelson. Entre 1977 a 1979 se implementó un plan piloto de vacunación con la cepa Rev1 en los departamentos de Ayacucho y Belgrano constituyendo la primera aplicación de la vacuna en el país (Casalis, 2013). Es de resaltar que actualmente la Provincia de San Luis no se encuentra anexado a un plan de vacunación de caprinos.

Durante el año 1979 se analizaron 10.367 sueros caprinos pertenecientes a 131 rebaños de los departamentos Belgrano, Ayacucho, La Capital, Chacabuco, Junín, Pringles y San Martín. El porcentaje de hatos infectados fue de casi el 25%, en tanto que la prevalencia individual fue 2.8% (determinados ambos por la prueba de aglutinación en placa de Huddelson) (Aguilera y col., 1979).

En la década del 90 se puso en marcha un plan caprino provincial donde se controlaron 440 hatos mediante Rosa de Bengala y 2ME, muestreándose el 10% de los animales de cada hato, con la intención de sangrar todo el rebaño, si algún animal resultaba positivo. El 4% de los hatos resultó positivo y tras 5 años de muestreo y sacrificio de los animales reaccionantes, se realizó un nuevo muestreo que arrojó el 2.2% de hatos positivos (Muñoz, 2001).

El Laboratorio de Salud Pública de la provincia realizó un relevamiento serológico en muestras de humanos, en el cual se procesaron cerca de 1000 sueros a través de la prueba de Huddelson, siendo reactivas 171 muestras. Este relevamiento se realizó desde el año 1999 hasta mediados de 2011. A su vez, se pudo calcular que el 89.5% presentaban valores cercanos al punto de corte o con reacciones de aglutinación leves. Según conclusiones de Ministerio de Salud, tales títulos serían indicativos y propios de una zona endémica como lo es la Provincia de San Luis. El 10.5% restante corresponde a 18 casos con títulos significativos (DPEyC, 2011).

En el año 2012, un grupo de trabajo en el marco del Programa Provincial de Control y Erradicación de la Brucelosis en Caprinos, realizó un muestreo estratificado según tamaño de majada para determinar la prevalencia de brucelosis. Se procesaron 7.047 sueros provenientes de 214 hatos y se utilizó BPA como prueba tamiz y SAT/2ME como pruebas complementarias. El 11.7% de los establecimientos resultaron positivos con al menos un animal reaccionante, alcanzando 1.05% de prevalencia individual en el total de las muestras (Delgado y col., 2012).

1.4. Brucelosis en humanos

La brucelosis humana es una de las zoonosis bacterianas de más amplia distribución geográfica y acarrea una significativa morbilidad en humanos (Acha y Szyfres, 2005; Corbel, 2006).

Aunque la falta de información hace que sea un desafío determinar la distribución y la carga real de la enfermedad causada por *Brucella* en humanos, diferentes estudios han demostrado que esta enfermedad es endémica en muchos países en vías de desarrollo, principalmente aquellos pertenecientes al Mediterráneo, Medio Oriente, Asia central, África sub Sahariana y América Latina. En países como Iraq, Jordania y Arabia Saudita se estima una incidencia de brucelosis humana mayor a 100 casos cada 100.000 habitantes por año, mientras que en África y América Latina es menor, pero aun así se presume que se encuentra dentro un rango entre 12.8 a 35 nuevos casos cada 100.000 habitantes por año (Pappas y col., 2006).

En humanos, esta enfermedad es causada principalmente por cuatro especies de *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*. La mayoría de los casos son atribuidos a *B. melitensis*, pero es posible que la infección sea causada en un número importante por alguna de las otras tres especies y se encuentre subestimada (Rubach y col., 2013; Khan y Zahoor, 2018).

Las infecciones raramente son fatales y los signos clínicos pueden variar desde una presentación aguda de un cuadro febril no específico a una forma crónica de una enfermedad debilitante (Buzgan y col., 2010). El periodo de incubación es de 2 a 24 semanas, requiriendo tratamientos prolongados, logrando la inhabilitación de los individuos afectados (Acha y Szyfres, 2005). Los signos clínicos más comunes son la presentación de fiebre crónica moderada, que tiende a la recidiva, seguida por dolor articular, muscular y de espalda, como resultado de la inflamación ocasionada por el patógeno en articulaciones y vértebras (Dean y col., 2012). Las infecciones con *Brucella* pueden también generar esplenomegalia, hepatomegalia y menos frecuentemente endocarditis y manifestaciones neurológicas (Young, 2018). En la mayoría de los casos, las infecciones se producen por el consumo de leche o

productos derivados lácteos no debidamente pasteurizados provenientes de animales enfermos (Traxler y col., 2013).

Los veterinarios, productores y personal de frigorífico son los que se encuentran bajo mayor riesgo por su exposición vía mucosas, contacto con fluidos corporales, tejidos y abortos de animales infectados (Traxler y col., 2013; Lowe y col., 2015). Existe frecuentemente un historial de la enfermedad dentro de los grupos familiares, debido a una exposición laboral al patógeno, relacionada a las prácticas de crianza de animales y al consumo de alimentos derivados de animales enfermos. Desde el punto de vista epidemiológico, son diferentes los casos de enfermedad en personas que han viajado a zonas endémicas y han consumido productos lácteos con deficientes medidas de higiene. Además, es considerada una de las enfermedades más comunes de adquisición en laboratorios en todo el mundo, ya que puede ser fácilmente transmitida por aerosoles, hecho por el cual se la ha considerado como una potencial arma biológica en el pasado (Pappas y col., 2006; Artenstein, 2017).

Es importante destacar que tanto la vía vertical como horizontal en el humano son muy raras y poco frecuentes (Khan y col., 2001; Kurdoglu y col., 2015), llevando a la conclusión, que los humanos son hospedadores accidentales y deben ser considerados un camino sin salida en lo que respecta a las especies mencionadas de *Brucella*. En la actualidad no existe una vacuna en humanos que prevenga las infecciones (Young, 2018).

1.5. *Brucella melitensis* en sus hospedadores de preferencia

Los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) son los hospedadores de preferencia para las infecciones por *B. melitensis* (Olsen y Palmer, 2014). Sin embargo, bovinos y otros rumiantes pueden también portar la enfermedad. Como ya se mencionó, la brucelosis es considerada

endémica en vastas regiones del mundo, donde los pequeños rumiantes son una de las principales fuentes de alimento y en algunos casos constituyen pequeñas economías de subsistencia para las poblaciones residentes (El-Sayed y Awad, 2018). En rebaños de cabras y ovejas, la principal signología clínica es la falla reproductiva caracterizada por abortos en los últimos estadios de la gestación, natimortos o nacimientos de crías débiles (Poester y col., 2013).

Es interesante destacar que una de las principales localizaciones de *B. melitensis* es la glándula mamaria en la mayoría de las infecciones agudas de hembras preñadas, generando la eventual dispersión del agente infeccioso por medio de la leche durante la lactancia. A su vez, este patógeno puede causar inflamación del tejido mamario con la consecuente disminución de la producción láctea. La vía de transmisión principal de la enfermedad es mediante el contacto entre animales susceptibles y las secreciones contaminadas del tracto genital femenino (Garin-Bastuji y Blasco, 2016). Ampliamente considerada como la más virulenta de todas las especies, también se ha consagrado como muy difícil de ser eliminada del ganado (Khan y Zahoor, 2018). Después de más de 130 años de su primer aislamiento, ninguno de los países principales fue capaz de erradicar la enfermedad (Zhang y col., 2018). Las cabras y las ovejas también son muy susceptibles a la infección por otras especies de *Brucella*, pero la enfermedad suele ser más variable y tiende a autolimitarse (Godfroid y col., 2011; Higgins y col., 2017).

La infección temprana cursa de manera subclínica. Sin embargo, la bacteriemia puede producir signos clínicos severos o inclusive la muerte de algunos animales. Los abortos aparecen en etapas tardías de la gestación, siendo posiblemente los únicos signos clínicos. A menudo no aparecen alteraciones manifiestas, aunque no es raro de encontrar

bronconeumonía, líquido pleural hemorrágico, tumefacción de linfonódulos, bazo e hígado. En los machos ocurre la infección de testículos, epidídimo, vesícula seminal y conductos deferentes ocasionando la disminución de la fertilidad (Higgins y col., 2017).

La localización de infecciones en la glándula mamaria con la consecuente mastitis es mucho más frecuente de observar en brucelosis caprina si se la compara con brucelosis bovina. Clínicamente se caracteriza por la formación de nódulos firmes y leche de aspecto acuoso con presencia de flóculos (Garin-Bastuji y Blasco, 2016).

1.6. Agente Etiológico

1.6.1. Características del género *Brucella*

El género se encuentra ubicado dentro de la familia *Brucellaceae*, perteneciente al orden de los Rhizobiales, en la clase Alphaproteobacteria del phylum Proteobacteria (Scholz y col., 2018). Los miembros de esta clase incluyen familias de organismos patógenos de plantas y animales, simbioses, en su mayoría asociados a la transmisión por vectores. El pequeño genoma de estos organismos se relaciona a la necesidad de ser patógenos intracelulares obligados para su supervivencia. Una característica que distingue a *Brucella* de la mayoría de otros géneros dentro del orden de Rhizobiales incluye la capacidad de infectar células mamíferas (característica compartida exclusivamente con *Bartonella*). Sin embargo, existen ciertas diferencias importantes entre *Bartonella*, patógeno intracelular obligado, y *Brucella*, patógeno intracelular facultativo. El genoma de *Brucella* spp. es 50-100% más largo que el genoma de *Bartonella* spp. y ha preservado una mayor cantidad de funciones metabólicas relacionadas con patógenos de plantas (Castaño y col., 2017). La persistencia en suelos por periodos de hasta 10 semanas es consistente con la habilidad metabólica de utilizar moléculas

basadas en estructuras vegetales. El genoma relativamente largo de *Brucella* sugiere su potencial capacidad de habitar diferentes escenarios tales como la adaptación preferencial a distintos hospedadores.

Mediante la evaluación de genomas de *Brucella* spp. se determinó la pérdida de funciones de genes, mediante la formación de pseudogenes, como así también la adquisición de importantes determinantes de virulencia durante su adaptación a la vida intracelular (Scholz y col., 2018).

Brucella representa un género en constante expansión de patógenos potencialmente zoonóticos. Originalmente fueron descritos en ganado y animales de compañía pero que en los últimos años se comenzaron a detallar nuevas especies relacionadas al ambiente marino y a animales de vida salvaje (incluyendo anfibios) (Godfroid y col., 2013). Las distintas preferencias de hospedadores se pueden asociar a cambios en estructuras superficiales de las células y a condiciones de crecimiento óptimas, como también a mecanismos de supervivencia dentro de células de mamíferos.

En el género encontramos una gran conservación de su composición genética. Algunas de las especies más recientes han sido descritas como pertenecientes al género, pero con ciertas características únicas, por lo que fueron catalogadas como “atípicas” basándose en la utilización de características fenotípicas y genotípicas. La mayoría de las especies son patógenos intracelulares facultativos de animales, pudiendo también estar presentes en humanos. Se encuentra un diferente tropismo por el huésped de preferencia de acuerdo a la especie, inclusive a nivel de biovares (Scholz y col., 2018).

La mayoría de los aislamientos suelen provenir de casos clínicos de la enfermedad o alimentos contaminados (principalmente derivados lácteos de animales enfermos). Los aislamientos se caracterizan por presentar requerimientos importantes para su crecimiento, como la incorporación de una atmósfera enriquecida con CO₂ especialmente en el primo-aislamiento. Las colonias tienden a ser transparentes, elevadas, convexas, con un borde completo y una superficie lisa y brillante que aparece de un color miel pálida o nacarada. Por el contrario, aquellas colonias conformadas por cepas atípicas podrán presentar una forma mucóide diseminada. El crecimiento se ve optimizado con la inclusión de suero o sangre en los medios. Frente a la tinción de Gram reaccionan en forma negativa, mostrando una forma de cocobacilos o bacilos cortos de un tamaño entre 0.5-0.7 µm de ancho y 0.6-1.5 µm, sin una agrupación característica. Son inmóviles, no se visualiza la presencia de cápsula ni la formación de esporas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y un pH entre 6.6 y 7.4. Son un género conformado por especies catalasa y oxidasa positiva, y ureasa variable (aunque la mayoría reacciona en forma positiva). Son microorganismos aeróbicos que poseen un metabolismo respiratorio, poseen un sistema de transporte de electrones basado en citocromos, con oxígeno o nitratos como aceptores finales de electrones y en general no fermentan azúcares (Alton y col., 1988). El genoma se encuentra conformado típicamente por 2 cromosomas circulares y carece de plásmidos (Liu, 2015).

Como se mencionó previamente, en los últimos años, se han descrito nuevas especies no convencionales. Las diferencias en su expresión fenotípica o en su conformación genética permitieron dividir al género en dos grandes grupos. El primer grupo, compuesto por especies “clásicas”, que incluye a *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*,

Brucella ovis y *Brucella neotomae* y las de más recientemente incorporación, *Brucella ceti*, *Brucella papionis* y *Brucella pinnipedialis*. El segundo grupo, se encuentra conformado por especies “atípicas”, *Brucella microti*, *Brucella inopinata* y *Brucella vulpis* (Tabla 1). El término “atípicas” se refiere tanto a las diferencias fenotípicas cuando se las compara con las “clásicas” y/o especies con alto grado de diversidad genética (Scholz y col., 2010; Whatmore y col., 2014; Al Dahouk y col., 2017; El-Sayed y Awad, 2018).

Mediante la visualización del aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, se pueden evidenciar diferencias entre algunas especies de *Brucella*, clasificándolas como colonias lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. papionis* y *B. vulpis* y, dentro de las segundas, *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto que adquieren las colonias se debe al tipo de expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie bacteriana. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo y el polisacárido O, también conocido como cadena O. Su presencia determina el aspecto característico de las colonias lisas (S-LPS). En caso de que la cadena O se encuentre ausente o presenta pocos residuos, las colonias tendrán características rugosas (R-LPS). El crecimiento de especies de características típicamente lisas en algunos medios de cultivo, principalmente líquidos o cultivos viejos, puede llevar a que experimenten mutaciones espontáneas que afectan la forma de expresión del LPS (Bowden y col., 2007). La cualidad de lisa o rugosa de una especie de *Brucella* se atribuye usualmente a su mayor o menor virulencia. El cambio visible de lisas a rugosas en las colonias generalmente sugiere una disminución en la virulencia de la especie, con la consecuente no inducción de anticuerpos detectables por las técnicas serológicas usuales de diagnóstico (anticuerpos contra el antígeno O).

Especie	Biovar	Req. CO2	Act. Ureasa	Prod. SH2	Medios con colorante		Aglutinación con sueros mono-específicos			Lisis pos fagos			
					Tionina	Fucsina	A	M	R	Tb	Wb	Bk	Fi
<i>B. abortus</i>	1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
	2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	4	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
	5	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
	6	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	9	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
	<i>B. suis</i>	1	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
2		-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+/-
3		-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+/-
4		-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+/-
5		-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+/-
<i>B. melitensis</i>	1	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	2	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	3	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>B. ovis</i>	∅	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. canis</i>	∅	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. neotomae</i>	∅	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
<i>B. ceti</i>	∅	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. pinnipedialis</i>	∅	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. microti</i>	∅	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>B. inopinata</i>	∅	-	+	+	+	+	-	+	SD	-	-	-	-
<i>B. papionis</i>	∅	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. vulpis</i>	∅	-	+	-	+	+	+	-	SD	+	+	+	+

Tabla 1: Diferenciación por características fenotípicas de especies de *Brucella* spp. Referencias: +: positivo; -: negativo; SD: Sin datos; Tb:

Tbilisi; Wb: Weybridge; Bk: Berkeley; Fi: Firenze

1.6.2. Características genéticas de *Brucella* spp.

A principios del siglo XX, se comenzaron a poner en evidencia mutaciones espontáneas que sucedían en *Brucella*. Las mutantes espontáneas más ampliamente estudiadas son las cepas vacunales, tales como *B. melitensis* Rev1, *B. abortus* cepa 19 y *B. abortus* RB51. Los estudios genéticos iniciales se focalizaron en la apariencia fenotípica, la estabilidad, el metabolismo y la resistencia de las colonias mutantes (Dorneles y col., 2015).

El genoma de *Brucella* contiene aproximadamente un 58 % de GC. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae*, and *B. suis* biovar 1 poseen cada uno dos cromosomas de 2.1 Mb y 1.15 Mb. *B. suis* biovar 2 y 4 poseen cromosomas de 1.85 Mb y 1.35 Mb, a la vez que *B. suis* biovar 3 tiene solamente un cromosoma de 3.1 Mb. Existe una homología de más del 90% entre las diferentes especies (Scholz y col., 2018).

Existen descritas secuencias de inserción (IS) las cuales son pequeños fragmentos de ADN que pueden moverse desde un sitio del genoma e interponerse en otro, promoviendo reacomodamientos genéticos. Estas estructuras se encuentran en ambos cromosomas de *Brucella*. Todas las especies contienen aproximadamente entre 8 y 35 copias de una secuencia de inserción denominada *IS711* (Mancilla y col., 2011). La posición y el número de copias varía según la especie y es una característica que permite diferenciar entre cada una de ellas. La detección de *IS711* constituye una valiosa herramienta para la tipificación de *Brucella* spp.

Por ejemplo, el gen *wboA* de *B. abortus* RB51 se encuentra interrumpido por una secuencia de inserción similar a *IS711* (Vemulapalli y col., 1999). Basándose en esto, un ensayo de PCR puede distinguir entre RB51 y su cepa original 2308 (Dorneles y col., 2015).

Actualmente no se encuentra descrita la presencia de plásmidos, pero a pesar de esto, se ha logrado la replicación de estas secuencias de ADN in vitro (Liu, 2015).

1.7. Análisis multilocus del número variable de repeticiones en tándem para el estudio de la diversidad genética de *B. melitensis*

Como se mencionó previamente, la homogeneidad genética de *Brucella* es de más del 90%, lo cual implica que existen limitadas secuencias polimórficas en genes constitutivos para proveer una resolución suficiente cuando se busca trazabilidad de los aislamientos (López-Goñi y O'Callaghan, 2012). Sin embargo, el esquema MLVA 16 (Bricker y col., 2003; Le Flèche y col., 2006; Al Dahouk y col., 2007) es una herramienta para identificar y subtipificar molecularmente aislamientos de *Brucella* y la información obtenida puede ser utilizada para el análisis de la diversidad genética y la trazabilidad de los mismos.

La completa secuenciación del genoma de *Brucella melitensis* (DeVecchio y col., 2002), *Brucella suis* (Tae y col., 2011) y *Brucella abortus* (Halling y col., 2005) han hecho posible la búsqueda de regiones de ADN con la suficiente variabilidad para que pudieran ser utilizadas para la identificación diagnóstica y la diferenciación.

Las secuencias o repeticiones en tándem son una clase de marcadores de importancia, dado que múltiples alelos pueden ser considerados para un determinado locus. Poseen también la ventaja de que la diferencia de tamaño de los mismos puede ser resuelta fácilmente mediante electroforesis (Le Flèche y col., 2006). Las repeticiones en tándem a menudo son clasificadas como satélites (del orden de megabases de ADN, presentes en la mayoría de los genomas eucariotas), minisatélites (conteniendo cientos de pares de bases con un tamaño de unidades

repetidas de hasta 9 pares de bases) y microsatélites (abarcando una decena de nucleótidos, un tamaño de unidad repetida de hasta 8 pares de bases) y han probado ser apropiadas para la tipificación de otras bacterias patógenas. Básicamente están compuestas por repeticiones de copias perfectas e imperfectas de una unidad elemental, y varios alelos pueden ser observados en diferentes aislamientos dentro de una misma especie (Al Dahouk y col., 2007)

La tipificación mediante la utilización de microsatélites aprovecha la ocurrencia de repeticiones en tándem de número variable que varían de 1 a 10 pb por repetición y de 1 a > 30 repeticiones por locus. Estos VNTR se han observado a lo largo de los reinos procariotas y eucariotas. Se cree que la adición o eliminación de unidades repetidas dentro de un locus está causada por un emparejamiento incorrecto de nucleótidos y/o por la ocurrencia de entrecruzamientos desiguales entre cadenas de ADN que aumentan la tasa de mutación en estos loci (López-Goñi y O'Callaghan, 2012). Las variaciones en el número de repeticiones dan lugar a alelos moleculares para un locus dado y ayudan en la caracterización del aislamiento. Cuando se analizan múltiples loci, la “huella dactilar” resultante puede ser altamente discriminatoria o incluso única. En una primera instancia de análisis se emplea la variación en las repeticiones en tándem de la secuencia de ADN “AGGGCAGT” en ocho loci del genoma. Esta técnica fue denominada “HOOF-prints” (Bricker y col., 2003).

Adicionalmente al panel “HOOF-prints” (a partir de ahora denominado panel 1), destinado principalmente a la identificación de *Brucella*, se agregan ocho microsatélites complementarios con un mayor poder discriminatorio (Panel 2). La información obtenida del análisis de ambos paneles es lo que compone el denominado MLVA 16 (Garofolo y col., 2013; Shevtsov y col., 2015; Sun y col., 2016; Liu y col., 2017). El panel 2 es usualmente dividido en

2 grupos, panel 2A, con los primeros 3 marcadores y panel 2B, con los cinco marcadores moleculares restantes. En el panel 2B están comprendidos los marcadores de mayor variabilidad. Además de la potencial alta resolución, MLVA 16 tiene una serie de otras ventajas técnicas, sobre todo su relativa simplicidad, tiempo de respuesta rápido, aplicabilidad a preparaciones no viables y/o crudas, y la capacidad de comparar fácilmente resultados digitales entre laboratorios (Whatmore y col., 2006).

1.8. Patogenia de la enfermedad

Los integrantes de la familia *Brucellaceae* poseen la particularidad de ser intracelulares facultativos, siendo su supervivencia y persistencia dependiente de la habilidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema reticuloendotelial (He, 2012).

Brucella ingresa al hospedador mediante ingestión, inhalación o penetración a través de lesiones en piel, incluso piel intacta o mucosa conjuntival. Al ingresar al organismo, pueden ser fagocitadas como parte de la respuesta inmune innata. La patogénesis depende principalmente de su relación con macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas y trofoblastos en lo que respecta a la supervivencia y replicación (Copin y col., 2012).

En el ingreso a la célula hospedadora *Brucella* debe enfrentar y sobrellevar condiciones adversas. El patógeno ha desarrollado diferentes estrategias para la evasión y la resistencia a los mecanismos intracelulares de defensa de la célula hospedadora. Es capaz de sobrevivir en células dendríticas, interfiere en la maduración de las mismas, altera el procesamiento de antígenos y compromete la respuesta inmunitaria del hospedador. Controla el ciclo celular para poder sobrevivir al ambiente hostil del hospedador hasta que la bacteria alcanza los compartimientos intracelulares (De Bolle y col., 2015). *Brucella* se encuentra bien equipada

para tolerar el stress fisiológico y metabólico esencial para su virulencia (Köhler y col., 2003). Previene la apoptosis del macrófago y permite que sobrevivan dentro del sistema retículo endotelial llevando a infecciones crónicas (Ahmed y col., 2016). Ha desarrollado la capacidad de controlar el tráfico intracelular de las vacuolas que la contienen luego de la fagocitosis, denominadas vacuolas contenedoras de *Brucella* (BCV), para evitar la fusión con lisosomas y bloquear la consecuente degradación (Celli y col., 2003). La fusión de las vacuolas con organelas como el retículo endoplásmico favorece en cierta forma la generación de un nicho replicativo seguro, protegiéndose de las condiciones nocivas intracelulares (Miller y col., 2017).

Durante la etapa inicial de la infección algunas bacterias son eliminadas, pero aquellas que permanecen viables, llegan por vía linfática a los ganglios regionales correspondientes, pudiendo desde allí invadir el torrente sanguíneo, donde serán fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) o macrófagos circulantes y transportadas a los diversos órganos, logrando la multiplicación y la supervivencia. El lipopolisacárido de las variantes lisas de *Brucella* se encuentra descrito como uno de los principales determinantes de virulencia. El S-LPS facilita la entrada a la célula, impide la fusión de la BCV con los lisosomas e inhibe la apoptosis de la célula. Existe un sistema regulador de dos componentes denominado BvrR/BvrS el cual es de gran importancia para la invasión y la supervivencia intracelular, actuando mediante la regulación de la expresión de las proteínas de membrana Omp3a y Omp3b. El cambio en la expresión de estas proteínas en la superficie de la membrana permite que *Brucella* se una y penetre dentro de la célula. Así también el factor de secreción tipo IV de *Brucella* codificado por el operón *VirB*, funciona como un reconocido factor que influye en la adherencia, el ingreso a la célula, la supervivencia y la replicación dentro de los macrófagos

(Dorneles y col., 2015). La presencia de endotoxinas y la hipersensibilidad a antígenos de *Brucella* podría explicar en cierta forma muchos de los síntomas de la infección, incluyendo la fiebre y la pérdida de peso (Seleem y col., 2010).

En las hembras preñadas, a medida que avanza la gestación, *Brucella spp.* se replica en forma marcada en los trofoblastos placentarios. La integridad de la placenta es alterada, logrando que se desencadene el característico aborto. El útero de la hembra preñada es un sitio inmunológicamente privilegiado, que previene la expulsión del feto mediante la modulación de la respuesta inmunitaria local y permite a *Brucella* replicarse en forma extensiva. El IFN- γ es una citoquina de suma importancia que controla la infección de *Brucella*. Una de las funciones más importantes es la estimulación de los mecanismos efectores para que la célula pueda deshacerse de la bacteria de su localización intrafagocítica (Carvalho Neta y col., 2010).

Se encuentra descrito un sistema de detección de quorum involucrado en la regulación de determinantes de virulencia de *Brucella*, más comúnmente relacionados a aquellos que se expresan en la superficie celular (Samartino y col., 2017). Cuando *Brucella* se encuentra en el espacio intracelular, existen señales que permiten detectar una limitante en el espacio o en las capacidades de la célula de lograr cubrir los requerimientos. Corresponde a la detección de “inanición” o de necesidades particulares. La habilidad de detectar limitantes en los recursos se encuentra directa o indirectamente involucrado en ajustar el metabolismo de *Brucella*, enlenteciendo el metabolismo basal, previniendo la multiplicación hasta que se alcance la formación del compartimento replicativo frente al cambio de perfil de nutrientes que enfrenta *Brucella* a lo largo de su tráfico intracelular (Terwagne y col., 2013). Finalmente, a través de procesos líticos y no líticos, el patógeno es liberado de la célula (Ke y col., 2015).

Sin embargo, cuando *Brucella* alcanza el RE, éste no solo provee de un nicho seguro, sino que también protege al patógeno de la fuerte acción bactericida de las células fagocíticas (Castano y Solera, 2009).

1.8.1. La respuesta inmune a la infección con *Brucella*

Debido a que *Brucella* tiene la capacidad de sobrevivir y replicar dentro de las células del hospedador la protección depende de células presentadoras de antígeno en lo que se refiere a inmunidad innata y en linfocitos T *helper* y citotóxicos en su inmunidad adaptativa para poder remover la bacteria y las células infectadas.

1.8.2. Participación de la Inmunidad innata en infecciones con *Brucella* spp.

Las células epiteliales constituyen la primera línea de defensa que evitan el ingreso de patógenos y pueden desencadenar una respuesta inmune a cargo de células profesionales. Éstas tienen la capacidad de expresar receptores pertenecientes al sistema inmune innato que reconocen patógenos y consecuentemente producen mediadores. *Brucella* spp. induce una débil respuesta pro-inflamatoria en el epitelio intestinal importante en la producción de citoquinas. Los jugos gástricos exponen a *Brucella* a un ambiente extremo, con un pH cercano a 2 y a enzimas digestivas. Las células M, que se encuentran en placas de Peyer y en tejido linfoide asociado a bronquios transportan a *Brucella* spp. desde la luz hasta las células del sistema inmune que se encuentran ubicadas en profundidad con el fin de estimular el sistema inmune innato mediante fagocitosis. Un segundo paso de la inmunidad innata incluye la acción de componentes celulares abarcando macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células T innatas que son capaces de reconocer a *Brucella* spp. y destruir la bacteria, junto a las células infectadas por fagocitosis o actividad citotóxica (Byndloss y Tsolis, 2016). De la

misma manera, las células M pueden inducir una respuesta inmune adaptativa a través del procesamiento y la presentación antigénica. Los macrófagos y las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno (CPAs) del sistema inmune innato que responde a la infección con *Brucella*. Ambos tipos de células tienen mecanismos inducibles para eliminar la bacteria. Las CPAs son las primeras células que reaccionan ante los microorganismos invasores y son responsables de la inducción de una respuesta adaptativa presentando epítopes antigénicos a los linfocitos T *helper*. El reconocimiento se realiza mediante receptores de reconocimiento de patrones expresados por CPAs que reconocen a estructuras conservadas asociadas a patógenos (PAMPs). Los principales PAMPs de *Brucella* incluyen el LPS, el ADN y lipoproteínas que son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR4, TLR6, TLR9 y TLR2). Como resultado, se producen citoquinas tales como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-1 β , IL-12 e IL-6, como así también expresa moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, que forman parte del sistema inmune innato y adaptativo. Las CPAs pueden procesar las bacterias fagocitadas en péptidos que son cargados sobre el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II localizados sobre la superficie de la célula. Estos complejos CMH-péptidos estimulan las células T. La estimulación de macrófagos con productos bacterianos IFN- γ y TNF- α desencadenan múltiples acciones antimicrobianas, incluyendo la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y del nitrógeno (Qian y Cao, 2018).

Los neutrófilos son rápidamente reclutados al sitio de la infección y eliminan a *Brucella* mediante fagocitosis, liberación hacia el medio extracelular de su contenido granular o secreción de citoquinas. Ciertas lipoproteínas de la membrana externa pueden activar funciones de los neutrófilos como son el estallido respiratorio, migración y supervivencia de

los neutrófilos. En contraste con los macrófagos, *Brucella* no es capaz de sobrevivir en neutrófilos a pesar de que aparentemente podría resistir el ataque de los mismos (Higgins y col., 2018).

Los linfocitos de la inmunidad innata, incluyendo linfocitos NK y células T $\gamma\delta$, pertenecen a un estrato intermedio entre la inmunidad innata y adaptativa. Comparando con los linfocitos T, conforman una proporción mucho menor en las células sanguíneas y reconoce antígenos no peptídicos sin estar asociados a un CMH. El rol más importante de estos linfocitos es la producción de IFN- γ antes de la expansión de una respuesta específica. Las células T $\gamma\delta$ muestran actividad protectora en etapas iniciales de la infección, inhibiendo el crecimiento de *Brucella* en macrófagos a partir de mecanismos de citotoxicidad, activación de macrófagos mediante la producción de IFN- γ y la secreción de compuestos bactericidas. Las células NK que fueron activadas por IL-12 y TNF- α atacan a las células infectadas con *Brucella* mediante efectos citotóxicos, a la vez que tienen un rol en la regulación de la respuesta por anticuerpos (Higgins y col., 2018).

1.8.3. Participación de la inmunidad adaptativa en la repuesta ante *Brucella* spp.

La inmunidad adaptativa se activa luego de la presentación de los epítopes de *Brucella* por parte de CPAs. El efecto antígeno específico y memoria permite eliminar los patógenos de manera rápida y efectiva. La inmunidad adaptativa consiste en el accionar de linfocitos T *helper*, células T citotóxicas, y linfocitos B productores de anticuerpos. Las células T activan funciones bactericidas en macrófagos mediante la producción de citoquinas como por ejemplo IFN- γ o ejerciendo efectos citotóxicos sobre células infectadas. Linfocitos B producen

anticuerpos específicos para un determinado antígeno con la capacidad de neutralizar u oponizar a *Brucella* (Perez-Sancho y col., 2014).

La inmunidad celular está representada principalmente por linfocitos T *helper* CD4+ (Th) y linfocitos citotóxicos CD8+ (LTc). Como consecuencia de la activación por parte de CPAs, células Th0 se diferencian a Th1 y Th2 mediante la estimulación por IL-12 o IL-4, respectivamente. Células diferenciadas en Th1 producen IFN- γ e IL-2 para activar la inmunidad mediada por células mientras que células Th2 principalmente producen IL-4, IL-5 e IL-10 para activar la inmunidad humoral. Las células Th2 estimulan a los linfocitos tipo B en la producción de inmunoglobulinas (Sung y Yoo, 2014).

Como se describió previamente, se requiere un T4SS funcional para la supervivencia de *Brucella spp.* dentro de los macrófagos y las células epiteliales. Fue demostrado que T4SS no sólo es importante para el establecimiento de la infección a largo plazo, sino también para la inducción de una respuesta tipo Th1 (Lacerda y col., 2013).

Esta función también fue demostrada por el hecho de que T4SS es necesario para la maduración de células B, para la activación de células T y para la secreción inicial de IL-12. Entre los factores de virulencia, T4SS es conocido por ser vital al momento de establecer una respuesta inmunológica, ya que son capaces de vehiculizar PAMPs, tales como flagelina, peptidoglicano, ácidos nucleicos o efectores dentro de la célula hospedadora (Dorneles y col., 2015).

1.9. Diagnóstico de brucelosis

1.9.1. Métodos diagnósticos serológicos

Aunque el aislamiento de *Brucella* spp. es evidencia irrefutable de la infección, los métodos serológicos son los más utilizados, debido a la gran sensibilidad y especificidad que poseen (SENASA, 2019).

La técnica convencionalmente usada como tamiz en el diagnóstico de brucelosis en Argentina es BPA (antígeno bufferado en placa), que se ejecuta con un antígeno preparado con la cepa de *B. abortus* 1119-3 (en fase lisa), que posee un pH final de 3.65. Luego de mezclar la muestra del suero con el antígeno ácido por 8 minutos, se debe visualizar aglutinación en el caso de animales enfermos. Tiene la capacidad de detectar anticuerpos contra el S-LPS de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, principalmente IgG1, disminuyendo la aglutinación por IgM. Por ser de alta sensibilidad, rápida, accesible y fácil de realizar se emplea para tener una pronta respuesta y descartar otras patologías de signología similar (Megid y col., 2010).

Las pruebas de seroaglutinación lenta en tubo detectan la presencia de los anticuerpos IgM e IgG. Los anticuerpos IgM aglutinan más intensamente que los IgG ya que, al ser moléculas pentavalentes, poseen un mayor número de sitios de unión. La prueba de 2-mercaptoethanol (2ME) es una prueba selectiva que detecta solamente la presencia de IgG y se basa en que los anticuerpos IgM, de configuración pentamérica, se degradan en cinco subunidades por la reducción de enlaces disulfuro, a partir de la acción del 2-mercaptoethanol. Las moléculas de IgG, en cambio, no sufren un efecto que altere su actividad para dar reacciones de aglutinación. La prueba se usa, por lo tanto, como evidencia presuntiva de la presencia de anticuerpos de la clase IgG (SENASA, 2019).

Los ensayos de fijación de complemento (FC) y polarización fluorescente (FPA), se utilizan como pruebas confirmatorias. De la misma manera que BPA, sirven para detectar anticuerpos contra todas las variantes lisas de *Brucella* spp. (Ducrotoy y col., 2018).

El ensayo de FC, requiere de un gran número de reactivos y constituye un desafío técnico importante, pero continúa siendo una prueba ampliamente utilizada de confirmación de brucelosis a nivel mundial. El test consiste en la incubación del antígeno celular completo (*B. abortus* 1119) con diluciones del suero problema (cuyo complemento endógeno fue previamente inactivado por calor) y una fuente titulada de complemento (usualmente suero de cobayo). Luego de un primer tiempo de incubación, se agrega una suspensión de eritrocitos ovinos sensibilizados con anticuerpos de conejo (anticuerpos anti-eritrocitos de oveja) constituyendo el sistema revelador y se procede a una segunda incubación.

Si en la primera incubación existió la formación de complejos inmunes debido a la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* en el suero problema (principalmente IgG1), el complemento resultará activado y por lo tanto no estará disponible para reaccionar en la segunda incubación con los eritrocitos ovinos, evidenciándose la ausencia de hemólisis. Por otro lado, si no existió la formación de complejos inmunes en la primera incubación, el complemento seguirá disponible para lisar los eritrocitos ovinos. Debido a que solo el isotipo IgG1 fija el complemento de manera eficiente, la especificidad del ensayo es alta. Este test no permite la diferenciación de animales vacunados (con las vacunas comercialmente disponibles en Argentina) (Nielsen y Yu, 2010).

Para el caso de FPA, el fundamento se basa en la velocidad de rotación de una molécula en solución a una tasa inversamente proporcional a su tamaño. Si ésta es marcada y examinada

en un plano de luz polarizada, se aprecia que las moléculas pequeñas giran a mayor velocidad en un determinado ángulo, que las moléculas más grandes. En el caso particular del diagnóstico de brucelosis, se utiliza un analizador de polarización fluorescente y como molécula antigénica un fragmento del polisacárido O de *Brucella*. La marcación se realiza con isotiocianato de fluoresceína. Al incubar la molécula marcada con anticuerpos contra el polisacárido O, se forman complejos inmunes que conlleva a un aumento del tamaño molecular, y, por lo tanto, una menor velocidad de giro. El dato es recogido por el equipo y transformado en unidades de milipolarización (mP). El ensayo tiene las ventajas de ser rápido, económico y brinda resultados de alta sensibilidad y especificidad (Nicola y col., 2010).

1.9.2. Diagnóstico bacteriológico de *Brucella* spp.

Es el método de diagnóstico de oro por su máxima especificidad. Sin embargo, el cultivo de *Brucella* spp. es un gran desafío. El aislamiento requiere un gran número de bacterias viables en la muestra clínica, un acondicionamiento adecuado y un procesamiento rápido en el laboratorio (Al Dahouk y col., 2003).

La contaminación con agentes ambientales es una complicación usual, dado que la mayoría de las veces las muestras provienen de tomas realizadas en malas condiciones. En el caso de abortos, los fetos suelen encontrarse con diferentes grados de descomposición, por lo que es difícil lograr aislamientos en pureza sin una correcta toma de muestra y un rápido y adecuado procesamiento en el laboratorio. La utilización de medios enriquecidos y selectivos suplementados con antibióticos (polimixina, bacitracina, cicloheximida, vancomicina, etc.) son una práctica común para la obtención de *Brucella* spp. en pureza e inhibir el crecimiento rápido de contaminantes (OIE, 2016).

Brucella spp. se clasifica como un organismo que debe ser manipulado dentro de laboratorios de bioseguridad tipo 3, siendo un requerimiento obligatorio el correcto equipamiento y el entrenamiento del personal (Sam y col., 2012; Olsen y Palmer, 2014). Las muestras de elección provenientes de ganado son las membranas fetales, específicamente cotiledones donde el microorganismo tiende a presentarse en altas concentraciones. También son de elección órganos fetales como pulmones, linfonódulos bronquiales, bazo, hígado y de preferencia contenido abomasal. En los animales adultos en pie, las muestras de leche, secreciones vaginales y semen permiten una mayor probabilidad de éxito al momento de lograr aislamientos (Alton y col., 1988). En el caso de tener acceso de muestras provenientes de necropsias o frigoríficos, los linfonódulos supramamarios, ilíacos, cervicales y mesentéricos, junto con bazo e hígado son los de preferencia. Las muestras deben arribar al laboratorio en el menor tiempo posible. En caso de demoras, deben ser mantenidas por congelamientos. En aquellas situaciones donde se estime bajo número de bacterias viables, es recomendado el uso de medios de enriquecimiento con el agregado de antibióticos para generar un medio selectivo (De Miguel y col., 2011).

1.9.3. Diagnóstico molecular de *Brucella* spp.

Los métodos bacteriológicos convencionales utilizados para el diagnóstico de brucelosis tienen grandes desventajas, principalmente aquellos destinados a la detección del agente etiológico. Los problemas radican al momento de evaluar la sensibilidad y los riesgos para la salud. La implementación de técnicas diagnósticas moleculares plantea una alternativa viable para lograr obtener valiosa información acerca *Brucella* spp. (Ciftci y col., 2017).

Los factores necesarios para poder implementar las técnicas y lograr una correcta optimización de los métodos incluyen los protocolos para la extracción de ADN, el tipo y

conservación de las muestras y particularidades propias de las técnicas con respecto a su límite de detección (Geresu y Kassa, 2016).

La detección molecular de *Brucella* spp. puede realizarse directamente de tejidos de animales infectados sin la necesidad del aislamiento previo del microorganismo, pudiéndose utilizar también como un complemento a la tipificación fenotípica convencionales. Las técnicas basadas en la amplificación de secuencias específicas mediante PCR logran caracterizar al género, a la especie e inclusive llegan a tener definición suficiente como para identificar biovars de *Brucella* spp. (OIE, 2016). La mayoría de los métodos diagnósticos moleculares tienen una sensibilidad que oscila entre un 50% y un 100% y una especificidad entre el 60% y el 98% (Yu y Nielsen, 2010).

1.10. Objetivos

1.10.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue el análisis de la variabilidad genética de *Brucella melitensis* en los departamentos de Libertador General San Martín, Ayacucho y Belgrano pertenecientes a la Provincia de San Luis.

1.10.2. Objetivos particulares

- Analizar la prevalencia actual a partir de los resultados serológicos confirmatorios de fijación de complemento y evaluar el desempeño de las técnicas serológicas implementadas en los programas de saneamiento de brucelosis caprina.
- Aislar *Brucella* spp. a partir de muestras procesadas de abortos, necropsias, leche y tipificarlos mediante los métodos fenotípicos tradicionales y genotípicos (PCR).
- Evaluar diferentes métodos de extracción de ADN a partir de muestras de tejidos de caprinos infectados para su posterior detección mediante PCR.
- Subtipificar los aislamientos mediante *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA), comparar los genotipos obtenidos entre ellos y con los presentes en la base de datos informática MLVA Bank.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Zona de estudio, establecimientos muestreados y animales afectados al estudio

La Provincia de San Luis desarrolla la cría extensiva de ganado caprino en el noroeste. Los principales departamentos productores son Ayacucho, Belgrano y Libertador General San Martín (Tabla 2).

Tabla 2. Ubicación de los departamentos estudiados

Departamento	Coordenadas
Ayacucho	32°36'00"S 66°07'00"O
Belgrano	32°39'00"S 66°27'00"O
Libertador Gral. San Martín	32°34'40"S 65°40'41"O

Los establecimientos que se analizaron fueron los que previamente se hubieran adherido al programa de control y erradicación de brucelosis y hayan estado de acuerdo con las pautas que principalmente establecían:

- Identificación y muestreo de sangre de todos los animales susceptibles del establecimiento.
- Diagnóstico serológico de brucelosis.
- Eliminación de los animales enfermos y reposición con animales sanos.

Los establecimientos fueron georreferenciados mediante la utilización del software Google Earth Pro®, desarrollado por Google (Google, 2019).

Se realizaron mapas de las localizaciones georreferenciadas y de los correspondientes genotipos utilizando el programa QGIS, versión 3.4.4 Madeira (QGIS, 2018).

El muestreo inicial para serología estuvo a cargo del Ministerio del Campo de la Provincia de San Luis (MdCdIPdSL), quienes identificaron todos los animales de los establecimientos mediante caravanas y tomaron las muestras de sangre. Luego de su actividad remitieron al Laboratorio de Brucelosis del Instituto de Patobiología los sueros que arrojaron resultados sospechosos o positivos a SAT/2ME para la ejecución de pruebas confirmatorias.

Un total de 3026 muestras de suero fueron analizadas. En su gran mayoría fueron muestras de suero caprinos (2472/3026, 81.7%) y en un menor número de cerdos (352/3026, 11.6%), bovinos (178/3026, 5.8%), ovinos (18/3026, 0.58%) y equinos (6/3026, 0.2%), las cuales se tomaron a medida que fue avanzando el plan de control y erradicación del MdCdIPdSL, por lo que no siguió un diseño de toma de muestras determinado. Inicialmente se planteó el objetivo de analizar la prevalencia actual de la enfermedad, pero ante la imposibilidad de llevar adelante un muestreo adecuado, su cumplimiento fue imposible de alcanzar.

La identificación serológica comenzó en el departamento Ayacucho, en las localidades georreferenciadas que presentaran producción de caprinos. El número los sueros remitidos por el MdCdIPdSL por departamento provincial fue 1123 del departamento Ayacucho, 714 de Belgrano y 635 del departamento San Martín.

2.2. Pruebas de diagnóstico serológico

Los sueros utilizados para caracterizar los animales para este estudio fueron clasificados como positivos o negativos según la combinación de FPA y FC. El criterio utilizado fue considerar un suero positivo si FC y/o FPA daban positivo. Se informó suero negativo en los casos en que FC

o FPA dieran negativas. Las pruebas utilizadas para confirmar fueron realizadas en serie, ejecutando inicialmente FC y en las situaciones en donde se requiera, FPA.

2.2.1. Análisis estadístico de las pruebas serológicas

Para evaluar las pruebas de BPA y SAT/2Me en caprinos se analizaron un total de 3.472 sueros (2.260 positivos y 1.212 negativos). Las pruebas de SAT/2ME fueron realizadas en paralelo por el laboratorio de red del MdCdIPdSL y los resultados fueron expresados en conjunto como una prueba única según el siguiente criterio: suero positivo= $SAT \geq 1/50$ y/o $2ME \geq 1/25$ y suero negativo= $SAT < 1/50$ y $2ME < 1/25$. Se descartaron para este análisis aquellos sueros que tuvieran marcada hemólisis, flóculos, contaminación visible o estuvieran en muy escasa cantidad. Tampoco se incluyeron los sueros con información incompleta o incorrecta. Los sueros negativos fueron remitidos específicamente para el presente análisis por el MdCdIPdSL.

Los resultados de las pruebas realizadas en INTA y en el MdCdIPdSL se cargaron en una tabla de contingencia 2x2 para cada una de ellas (BPA y SAT/2Me) (Analytical, 2019). La sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) se determinó en forma relativa a la combinación de FPA/FC. Para calcular estos parámetros se realizó una clasificación cruzada de pruebas como se muestra en la tabla 3 (Analytical, 2019).

Tabla 3. Modelo de clasificación cruzada de pruebas

Prueba X	Infectado (VP)	Sano (VN)	Total
Positiva	a	b	a+b
Negativa	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Para obtener la sensibilidad y especificidad de las pruebas combinadas en serie se realizó una prueba en primer lugar (tamiz), y luego otra prueba (confirmatoria) sólo si el individuo resultó positivo a la primera. Al final, se consideró positivo al animal que tuvo resultados positivos en todas las pruebas y negativos a todos los demás. Mediante este método se reducen los falsos positivos y aumenta la especificidad (Tarabla, 2000).

Para calcular los valores de sensibilidad y especificidad en serie (BPA + SAT/2Me) se realizó el siguiente cálculo:

$$Se (e) = Se (a) \times Se (b)$$

$$Sp (e) = 1 - (1 - Sp (a) * (1 - Sp(b)))$$

Dónde: Se (e) es la sensibilidad de las pruebas combinadas, Se (a) es la sensibilidad de la prueba a (tamiz), Se (b) es la sensibilidad de la prueba b (complementaria), Sp (e) es la especificidad de las pruebas combinadas, Sp (a) es la especificidad de la prueba a tamiz y Sp (b) es la especificidad de la prueba b (complementaria).

2.2.2. Prueba de antígeno tamponado en placa

Es una prueba tamiz de aglutinación en placa. Se fundamenta en la inhibición de las aglutininas inespecíficas a bajo pH. Detecta anticuerpos IgG y algunos IgM específicos.

Las reacciones se clasifican en:

Positiva: Formación de grumos, aun siendo finos (no confundir con artefactos producidos por impurezas, hemólisis, etc.) (Figura 1A).

Negativa: La mezcla suero-antígeno es de turbidez homogénea y sin grumos (Figura 1B).

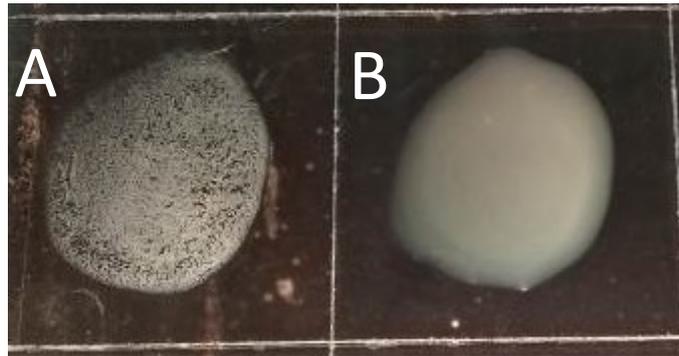


Figura 1. Lectura de BPA positiva (A) y negativa (B)

2.2.3. Ensayo de polarización fluorescente

El ensayo de FPA para la detección de anticuerpos contra *Brucella spp.* tiene la capacidad de ser una prueba multiespecie, que permite el diagnóstico presuntivo en bovinos, porcinos, caprinos, ovinos y especies silvestres.

El fundamento de este método se basa en la rotación de un pequeño antígeno de SLPS de *Brucella*, marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT), el cual es excitado por una luz polarizada a una determinada longitud de onda (Nielsen y Gall, 2001). La tasa de rotación de la molécula antigénica es reducida cuando su tamaño aumenta mediante su unión con anticuerpos provenientes de las muestras serológicamente positivas.

Los reactivos son agregados secuencialmente en solución y el tiempo total de la prueba no excede los 5 minutos para sueros frescos.

Los resultados son expresados en unidades de mili polarización (mP) y se consideran positivos caprinos con valores mayores a 85mp.

Si los controles están fuera de los límites especificados, la prueba será rechazada y los controles y las muestras deberán ser repetidas.

2.2.4. Fijación del complemento

La fijación del complemento es la prueba de referencia internacional para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, ovina y caprina. La prueba permite la detección y cuantificación relativa de los anticuerpos específicos hacia *Brucella* "capaces de fijar" el complemento (IgG1 y parcialmente IgM específicas), cuya presencia en determinados niveles posee una gran correlación con el estado de "animal infectado" (SENASA, 2019).

La FC es una prueba confirmatoria ampliamente usada y aceptada, pese a la complejidad de su realización y a la necesidad de buenas instalaciones y personal entrenado para el mantenimiento de los reactivos adecuadamente.

La micro técnica, se realiza en placas de polipropileno de 96 pocillos, fondo en U con capacidad para 250 µl. La prueba se realiza a un volumen final de 100 µl.

El grado de fijación del complemento se observa en la presencia o ausencia de hemólisis del sistema revelador hemolítico. Se expresa en forma de UIFC (unidades internacionales fijadoras del complemento) referido a la dilución de la muestra de suero (1/4, 1/8, etc.) seguido de 1, 2, 3 o 4 cruces según el grado de hemólisis en dicha dilución. El título menor que se determina es 1/4 + (que corresponde a 16 UIFC) y el rango de trabajo está comprendido entre 1/4 + y 1/256 +++++ (16 a 1323 UIFC). Se considera resultado positivo en caprinos cualquier valor ≥ 20 UIFC (1/4 ++) (Tabla 4).

Reacción positiva:

- Se observa sedimentación en grado variable de los eritrocitos en el fondo del pocillo
- El sobrenadante puede tener un tinte rojizo en función de la presencia de hemólisis
- El grado de hemólisis debe cuantificarse y consignarse mediante un sistema de cruces

- a. +: sobrenadante rojizo en un 75% de intensidad; en el fondo un depósito muy tenue de eritrocitos: equivalente a un 75% de hemólisis.
- b. ++: sobrenadante rojizo en un 50% de intensidad; en el fondo un depósito tenue de eritrocitos: equivalente a un 50% de hemólisis.
- c. +++: sobrenadante rojizo en un 25% de intensidad; en el fondo un depósito claro de eritrocitos: equivalente a un 25% de hemólisis.
- d. ++++: fijación completa. Sobrenadante translucido, en el fondo de la placa un botón de depósito de eritrocitos: equivalente a un 0% de hemólisis.

Reacción negativa:

- Se observa 100% de hemólisis con ausencia de depósito de eritrocitos.

Determinación del título del suero

El título se establece a partir de la dilución más alta del suero que siga dando un grado de sedimentación de los eritrocitos y el grado de fijación será determinado mediante el sistema de cruces descripto (Figura 2).

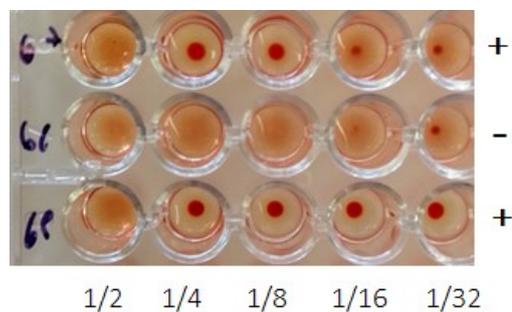


Figura 2. Reacciones positivas y negativas a fijación de complemento

Tabla 4. Tabla de equivalencias para la conversión en UIFC utilizando el grado de hemólisis en función de la dilución

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

2.3. Bacteriología

El aislamiento bacteriológico es lento, y laborioso, pero es la técnica “gold standard” necesaria para confirmar la enfermedad y determinar las características de *B. melitensis*. Obtener aislamientos permite llegar a un mayor nivel de caracterización y definición de la enfermedad. Es un método de baja sensibilidad, por lo que debe optimizarse el tipo y número de muestras,

la forma de conservación, la cantidad sembrada y los medios de cultivo utilizados (enriquecimiento, selectivos).

2.3.1. Muestras de tejidos

Las muestras se obtuvieron de 31 establecimientos, abarcando 13 localidades de los partidos Ayacucho, Belgrano, General San Martín, Juan Martín de Pueyrredón (Figura 3), mediante la realización de necropsias según técnica convencional de caprinos serológicamente positivos realizadas a campo (Robles y Uzal, 1991).

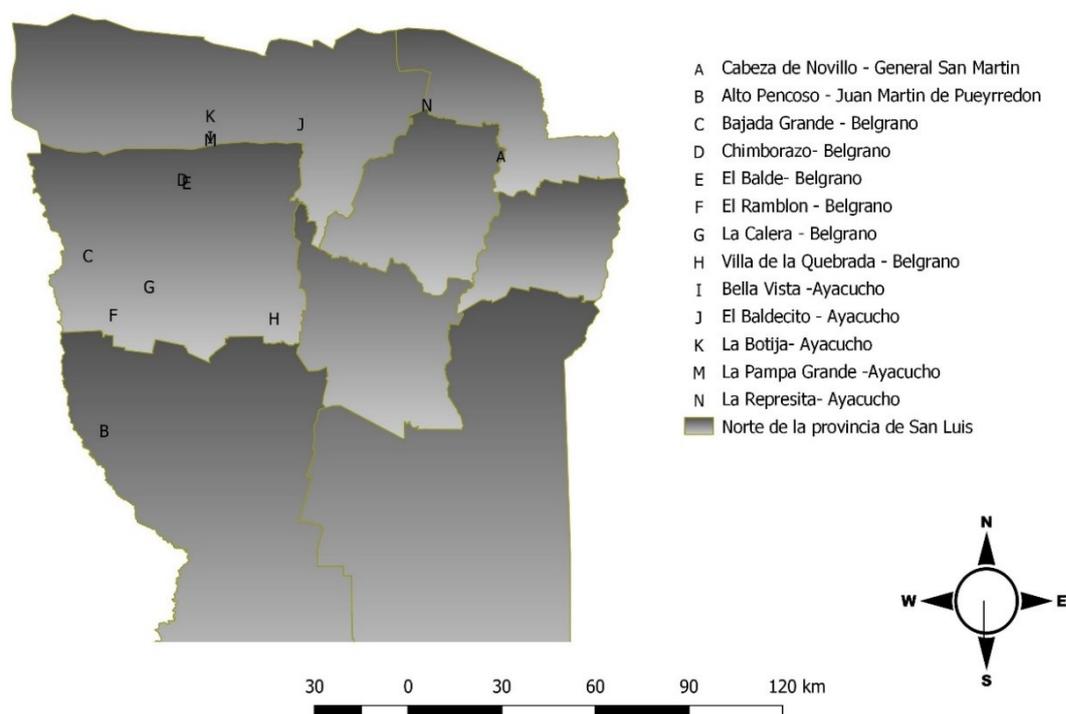


Figura 3: Mapa de la ubicación de las localidades sobre las cuales se realizaron muestreos para la obtención de tejidos.

Se tomaron muestras de bazo, hígado, linfonódulos mamarios, linfonódulos inguinales superficiales, testículo, epidídimo, leche, semen, glándula mamaria, líquido sinovial, contenido abomasal de fetos abortados. Las muestras fueron recogidas con material estéril, y acondicionadas en tubos tipo Falcon de 50 ml. Se conservaron en hielo hasta el destino final (Laboratorio de Brucelosis, Instituto de Patobiología, INTA Castelar).

2.3.2. Obtención de aislamiento de *Brucella* spp.

Se utilizaron diferentes estrategias con el fin de aumentar las posibilidades de obtener aislamientos en pureza:

- Siembra en Caldo *Brucella* para su enriquecimiento y repiques diarios en medio selectivo (*Brucella* Selective Supplement 00083A, OXOID ®)
- Impronta de tejido en medio sólido (selectivo/basal)
- Enriquecimiento en medio selectivo (con el agregado de antibióticos) y repiques diarios en medio sólido
- Siembra directa en medio selectivo sólido (Agar Triptosa, DIFCO ®)
- Siembra en Agar Sangre

Las siembras fueron incubadas a 37 °C durante 2 semanas, por duplicado, con y sin una atmósfera al 5% de CO₂. Todas las siembras se observaron cada 24 hs. A partir de los caldos sembrados se realizaron repiques diarios en placas de Agar *Brucella* adicionadas con antibióticos. Finalmente, de aquellas muestras que resultaron negativas se procedió a realizar un procesamiento en conjunto de los tejidos del mismo animal (pool), procesándolos en un mortero cerámico estéril y sembrando el material utilizando las diferentes estrategias antes mencionadas.

Las colonias compatibles con *Brucella* spp. según sus características morfológicas fueron observadas realizando tinción de Gram según la técnica habitual (Alton y col., 1988). Los aislamientos a confirmar se repicaron en Agar Triptosa y se practicaron las siguientes pruebas bioquímicas:

- Prueba de la catalasa
- Prueba de la oxidasa
- Producción de ácido sulfhídrico
- Prueba de la ureasa (método de Bauer)
- Crecimiento en medios de inclusión con colorantes (fucsina y tionina)
- Aglutinación con solución de acriflavina
- Aglutinación con sueros monoespecíficos A y M

Los aislamientos que presentaron las características compatibles con *B. melitensis* fueron sembrados en caldo *Brucella* con el agregado final de 30% de glicerol estéril y conservados a -70°C.

2.4. Tipificación molecular de *B. melitensis*

2.4.1. Métodos de extracción y purificación de ADN

Se utilizaron 3 métodos de extracción de ADN para evaluar el desempeño de cada uno: el método clásico basado en fenol, cloroformo y alcohol isoamílico; un método con una resina quelante y proteinasa K y finalmente un kit comercial fabricado por QIAGEN®.

Método de extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico

Soluciones de trabajo

Buffer de lisis

- 20 mM Tris-Hcl
- 5 mM EDTA (pH 8)
- 400 mM NaCl
- 1% SDS
- Proteinasa k 400 µg/ml

Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) (Invitrogen[®])

Buffer TE

- 1 M Tris-Hcl (pH 8)
- 0.5 M EDTA (pH 8)

Procedimientos

- Colocar 20 a 50 mg de tejido en un microtubo de 1.5 ml
- Agregar 750 µl de buffer de lisis
- Incubar por 8-12 hs a 55 °C con agitación
- Agregar igual volumen de una solución e incubar 30 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a 720 g durante 5´
- Transferir la fase acuosa a tubo nuevo
- Precipitar ADN con 750 µl de Isopropanol
- Centrifugar a 13.600 g durante 15´
- Remover el Isopropanol y resuspender en etanol 70%
- Centrifugar a 13.600 g durante 15´

- Remover el Etanol 70% y dejar secar 15´
- Disolver el pellet en buffer TE

Método de extracción con Chelex[®] y proteinasa k

Soluciones de trabajo

- Chelex[®] 10 %
- Solución de proteinasa k 20 mg/ml

Procedimientos

- Colocar 20-50 mg de tejido homogeneizado en un microtubo de 1.5ml
- Agregar 500 µl de Chelex al 10 % y 10 µl de solución de proteinasa k
- Incubar a 55 °C durante 8 hs
- Llevar a ebullición los microtubos durante 15´
- Colocar 2.5 volúmenes de etanol 100%
- Centrifugar a 13.600 g durante 15´
- Remover el etanol 100% y resuspender en etanol 70%
- Centrifugar a 13.600 g durante 15´
- Eliminar sobrenadante y dejar secar 15´
- Disolver el pellet en buffer TE

Método utilizando el kit comercial de extracción QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®)

El procedimiento se realizó según indicaciones del fabricante (QIAGEN, 2016).

Se analizó la capacidad de detección del ensayo de PCR en base a los métodos propuestos de extracción de ADN a partir de tejidos de animales sanos inoculados artificialmente con la cepa de referencia *B. melitensis* 16M.

2.4.2. Tipificación molecular de *Brucella melitensis*

El ensayo de PCR original se encuentra diseñado como una PCR tipo múltiple para la identificación de las diferentes especies de *Brucella*. Para el desarrollo del presente trabajo sólo se seleccionó el juego de cebadores destinados a la tipificación de *B. melitensis* (Tabla 5). El ensayo utiliza el cebador reverso, que identifica *IS711* característico del género *Brucella* y un cebador directo que proporciona identidad de especie, generando un amplicón de 732 bp en el caso de ser *Brucella melitensis* (Bricker y Halling, 1995).

Tabla 5. Cebadores utilizados para la tipificación de *B. melitensis*

Nombre	Blanco	Secuencia (5'-3')	Programa amplificación
BMEL-F	IS711	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA	95° C, 5 min (1 ciclo); 94°C 75", 55.5°C 120", 72°C 12" (35 ciclos)
IS711-R		TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT	

Comparación de los diferentes métodos de extracción de ADN

Se utilizó un test de proporciones para evaluar el desempeño del ensayo de PCR con respecto a los diferentes métodos de extracción. Se aplicaron los diferentes métodos de purificación de ADN sobre los tejidos en los que previamente se obtuvo aislamientos de *B. melitensis*. Se utilizó inicialmente para evaluar el límite de detección del ensayo un pool de tejidos

provenientes de animales sanos (linfonódulos y bazo) sobre los cuales se inocularon diferentes concentraciones de *B. melitensis* 16M (1 UFC/mg de tejido a 5000 UFC/mg de tejido).

2.4.3. Subtipificación molecular mediante MLVA 16

Los 16 marcadores necesarios para la subtipificación fueron divididos en 3 paneles (1, 2A y 2B) (Tabla 6) y se utilizó el protocolo con los pares de cebadores descritos por Le Flèche y colaboradores y modificado por Al Dahouk y colaboradores para su amplificación (Tabla 7) (Le Flèche y col., 2006; Al Dahouk y col., 2007; I2BC, 2018).

Tabla 6. Marcadores analizados en cada uno de los paneles de MLVA16

Panel 1	Panel 2A	Panel 2B
bruce06	bruce18	bruce04
bruce08	bruce19	bruce07
bruce11	bruce21	bruce09
bruce12		bruce16
bruce42		bruce30
bruce43		
bruce45		
bruce55		

Condiciones de reacción para la amplificación de los locus

- Desnaturalización inicial a 94° C durante 3´
- 30 ciclos de 94° C por 30", 60° C por 30" y 72°C por 50 "

Como control positivo se utilizó la cepa *B. melitensis* 16M, cuyos amplicones son conocidos.

Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los marcadores

Nombre	Secuencia (5' - 3')
Bruce06F	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG
Bruce06R	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC
Bruce08F	ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC
Bruce08R	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC
Bruce11F	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC
Bruce11R	CCAGACAACAACCTACGTCCTG
Bruce12F	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA
Bruce12R	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC
Bruce42F	CATCGCCTCAACTATAACCGTCA
Bruce42R	ACCGCAAATTTACGCATCG
Bruce43F	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT
Bruce43R	TATTTTCCGCCTGCCATAAAC
Bruce45F	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG
Bruce45R	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG
Bruce55f	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT
Bruce55R	AATCTGGCGTTTCGAGTTGTTCT
Bruce18F	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT
Bruce18R	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG
Bruce19F	GACGACCCGGACCATGTCT
Bruce19R	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT
Bruce21F	CTCATGCGCAACCAAAACA
Bruce21R	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT
Bruce04F	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG
Bruce04R	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG
Bruce07F	GCTGACGGGGAAGAACATCTAT
Bruce07R	ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAA
Bruce09F	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC
Bruce09R	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG
Bruce16F	ACGGGAGTTTTTGTTGCTCAAT
Bruce16R	GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT
Bruce30F	TGACCGCAAACCATATCCTTC
Bruce30R	TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG

Los amplicones fueron visualizados mediante la siembra y corrida en condiciones estándar en gel de agarosa al 2% para los loci del panel 1 y al 3% para los loci del panel 2A y 2B. Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio, visualizados mediante luz UV y fotografiados para su posterior análisis.

La estimación del tamaño de las bandas se realizó teniendo como patrón 2 marcadores de peso molecular (100bp y 25 bp). Se calculó el tamaño de los amplicones utilizando la herramienta informática *gel analysis* (UVIpro®) (UVITEC, 2010).

Se utilizó la tabla de conversión para estimar el número de repeticiones en función del tamaño de bandas propuesto por Le Flèche (Le Flèche y col., 2006).

2.4.4. Análisis del poder discriminatorio y de la relación genética

IDGH es un estimador ampliamente utilizado para informar acerca de la diversidad y variabilidad de diferentes marcadores moleculares de bacterias patógenas, encontrada por diferentes métodos de subtipificación (Hunter y Gaston, 1988). Hunter y Gaston propusieron la utilización del índice de diversidad de Simpson para medir la habilidad discriminatoria de los diferentes métodos. IDHG indica la probabilidad de que dos genotipos pertenezcan a grupos diferentes. El cálculo se realizó siguiendo la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N - 1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

Siendo D el poder discriminatorio, N el número de cepas no relacionadas evaluadas, S el número de cepas distintas y x_j el número de cepas que pertenecen al genotipo j, asumiendo que las cepas se pueden clasificar en categorías mutuamente excluyentes.

El IDHG global de todo el método se estimó considerando cepas sin relación epidemiológica a través de un programa de la Universidad del País Vasco, disponible públicamente (UBC, 2019).

Con la herramienta libre V-DICE del sitio web de HPA (HPA, 2019) se determinó el poder de discriminación de cada uno de los marcadores. El análisis de la relación genética entre los

aislamientos se realizó mediante el algoritmo goeBURST (Francisco y col., 2009). Este algoritmo construye complejos clonales compuestos por aquellos genotipos relacionados entre sí y que sólo varían en 1 a 3 marcadores del total de 16 estudiados.

Los gráficos de relación genética fueron realizados mediante la utilización del software de acceso libre Phyloviz 2.0 (PHYLOViZ, 2016).

Se construyeron dendrogramas basados en el método UPGMA (método de agrupamiento de pares no ponderados con la media aritmética) (Rizzo y Rouchka, 2007). UPGMA utiliza un enfoque directo para construir un árbol filogenético a partir de una matriz de distancia que asume implícitamente una tasa de sustitución constante, a lo largo del tiempo y linajes filogenéticos (conocida como la hipótesis del reloj molecular).

2.4.5. Comparación de los genotipos descriptos con bases de datos cooperativas

La base de datos con mayor información es MLVA Bank, que se encuentra curada por Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, que pertenece a la universidad de Paris-Saclay (I2BC, 2018).

Los datos que se comparan son las repeticiones de cada locus en orden, con las presentes en la base de datos y permite asignar los genotipos a los distintos grupos conformados en forma estable, permitiendo estimar posibles orígenes.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación serológica de animales infectados

Inicialmente se planteó el objetivo de analizar la prevalencia actual de la enfermedad, pero ante la imposibilidad de llevar adelante un muestreo adecuado, su cumplimiento fue imposible de alcanzar. Las muestras fueron tomadas por conveniencia de acuerdo al acceso que se tuviera a las mismas.

El primer análisis serológico lo realizó el laboratorio de red del MdCdIPdSL mediante pruebas de BPA y SAT/2ME. Una vez obtenidos los resultados, las muestras positivas y sospechosas fueron remitidas al laboratorio de brucelosis de INTA Castelar para la realización de las pruebas confirmatorias.

Del análisis de un total de 2472 sueros caprinos positivos a pruebas de aglutinación se identificó 2428 sueros positivos. Las pruebas confirmatorias aplicadas sobre los sueros de los diferentes departamentos mostraron que 1102 animales fueron positivos en el departamento Ayacucho, 698 en el Belgrano y 628 en San Martín.

El resultado del resto de las especies animales de las cuales se procesaron muestras fue negativo.

3.1.1. Análisis comparativo de las pruebas serológicas

En la tabla 8 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad para cada una de las pruebas serológicas individuales que se realizaron. También se muestra el valor de sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas en serie, siempre tomando como referencia las pruebas de FPA y FC.

Tabla 8. Sensibilidad y especificidad de las pruebas combinadas en serie

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
BPA	0.994	0.827
SAT/2ME	0.987	0.924
BPA+SAT/2ME	0.822	0.986

3.2. Aislamientos obtenidos de *Brucella melitensis*

Se procesaron muestras (bazo, linfonódulos, hígado, testículo, epidídimo, semen, leche, líquido sinovial y contenido abomasal de abortos) de un total de 104 animales, de los cuales 98 fueron caprinos y 6 fueron ovinos. Se obtuvieron 32 aislamientos de *Brucella melitensis* biovar 1, los cuales fueron identificados mediante métodos bacteriológicos clásicos (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la tipificación de los aislamientos obtenidos en el presente estudio

Resultados tipificación bacteriológica clásica de <i>Brucella melitensis</i>	
	Cocobacilo
Morfología y tinción de Gram	Gram (-)
Prueba de catalasa	Positivo
Prueba de oxidasa	Positivo
Requerimiento de Co ₂	Negativo
Prueba de ureasa	Positivo
Producción de SH ₂	Negativo
Crecimiento en tionina	Positivo
Crecimiento en fucsina	Positivo
Suero monoespecífico "A"	Negativo
Suero monoespecífico "M"	Positivo
Suero monoespecífico "R"	Negativo
Lisis por fago Tb	Negativo

De los aislamientos obtenidos, el 60% (19/32) fueron recuperados de muestras de linfonódulos (generalmente supramamarios), el 34% (11/32) provinieron de muestras de bazo, y los 2 aislamientos bacterianos restantes fueron obtenidos a partir del procesamiento de un pool de muestras provenientes de un mismo animal. No se obtuvieron aislamientos en forma simultánea en más de un órgano del mismo animal (Tabla 10) ni del resto de los tejidos procesados que no fueron mencionados.

Las estrategias destinadas a mejorar la sensibilidad del aislamiento bacteriano tuvieron diferente desempeño. La utilización de medios selectivos permitió obtener el 94 % de los aislamientos, ya sea utilizando antibióticos en el caldo durante el enriquecimiento o directamente agregando en el medio sólido. La siembra en Agar Sangre favoreció el desarrollo de 2 aislamientos (2/32), mientras que el crecimiento con las otras estrategias en los mismos tejidos fue negativo.

No se recuperaron aislamientos de los tejidos provenientes de ovinos, pero sí se logró confirmar la presencia del agente por técnicas moleculares, como se mostrará en las próximas secciones.

Tabla 10. Georreferencia y órgano de procedencia de los 32 aislamientos de *B. melitensis* obtenidos de los departamentos del noroeste de San Luis

ID	Identificación	Localidad	Departamento	Latitud	Longitud	Órgano
5	<i>B. melitensis</i> bv1	El Balde	Belgrano	32°29'18.55"S	66°40'26.17"O	LNN
16	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'31.65"S	66°34'40.15"O	Bazo
17	<i>B. melitensis</i> bv1	Alto Pencoso	Pueyrredon	33°27'56.06"S	67° 0'31.29"O	LNN
23	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	LNN
24	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	LNN
29	<i>B. melitensis</i> bv1	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	LNN
30	<i>B. melitensis</i> bv1	Chimborazo	Belgrano	32°29'5.79"S	66°40'42.46"O	LNN
34	<i>B. melitensis</i> bv1	La Pampa Grande	Ayacucho	32°19'12.49"S	66°34'38.00"O	Bazo
35	<i>B. melitensis</i> bv1	La Pampa Grande	Ayacucho	32°19'12.49"S	66°34'38.00"O	LNN
36	<i>B. melitensis</i> bv1	La Pampa Grande	Ayacucho	32°19'12.49"S	66°34'38.00"O	Bazo
40	<i>B. melitensis</i> bv1	Cabeza de Novillo	San Martin	32°22'59.42"S	65°23'58.20"O	Bazo
41	<i>B. melitensis</i> bv1	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Bazo
46	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°14'11.45"S	66°34'45.75"O	LNN
48	<i>B. melitensis</i> bv1	Alto Pencoso	Pueyrredon	33°27'56.06"S	67° 0'31.29"O	LNN
50	<i>B. melitensis</i> bv1	Alto Pencoso	Pueyrredon	33°27'56.06"S	67° 0'31.29"O	LNN
52	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	LNN
53	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	LNN
54	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	LNN
55	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Bazo
56	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	LNN
57	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Bazo
58	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Bazo
63	<i>B. melitensis</i> bv1	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	LNN
64	<i>B. melitensis</i> bv1	Chimborazo	Belgrano	32°28'35.06"S	66°41'25.25"O	LNN
66	<i>B. melitensis</i> bv1	Chimborazo	Belgrano	32°28'35.06"S	66°41'25.25"O	LNN
69	<i>B. melitensis</i> bv1	El Baldecito	Ayacucho	32°14'19.32"S	66°14'9.83"O	Bazo
71	<i>B. melitensis</i> bv1	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	LNN
73	<i>B. melitensis</i> bv1	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	LNN
75	<i>B. melitensis</i> bv1	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Pool
78	<i>B. melitensis</i> bv1	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Pool
82	<i>B. melitensis</i> bv1	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Bazo
83	<i>B. melitensis</i> bv1	La Botija	Ayacucho	32°14'11.45"S	66°34'45.75"O	Bazo

3.3. Elección y estandarización del método de extracción de ADN de tejidos y desempeño de PCR

La utilización de fenol-cloroformo-isoamílico y proteinasa k + Chelex® permitieron la detección entre 700 y 1000 UFC/mg de tejido, mientras que la utilización del kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)® permitió detectar la presencia entre 5 y 50 UFC/mg de tejido.

Posteriormente, la extracción de ADN total de los 32 tejidos de animales serológicamente positivos sobre los cuales previamente se logró aislamiento de *B. melitensis* permitió observar las capacidades y las limitantes de cada uno de los métodos empleados (Tabla 11). El test de proporciones aplicado sobre los diferentes métodos no permitió distinguir una mayor capacidad de detección por parte de alguno de los métodos en particular. En los gráficos se observa una tendencia de detección mayor por parte de la utilización de kit comercial. Es decir, de un total de 32 muestras positivas por aislamientos, el kit comercial permitió detectar la presencia de *B. melitensis* en el 97% (31/32), mientras que los otros 2 métodos no superaron el 85% (27/32) (Figura 4).

Tabla 11. Capacidad de detección de la PCR a partir de diferentes métodos de extracción de ADN

ID muestra	Tejido	Fenol-cloroformo-isoamílico	Pk+Chellex	QIAamp DNA Mini Kit
1	Lnn	+	+	+
2	Lnn	+	+	+
3	Lnn	+	+	+
4	Lnn	+	+	+
5	Lnn	-	-	+
6	Lnn	+	+	+
7	Pool	-	+	+
8	Lnn	+	+	+
9	Bazo	+	+	+
10	Lnn	+	+	+
11	Lnn	+	+	+
12	Lnn	+	+	+
13	Bazo	+	+	+
14	Bazo	+	+	+
15	Lnn	-	-	+
16	Lnn	-	+	+
17	Bazo	-	+	+
18	Bazo	+	+	+
19	Pool	-	-	-
20	Bazo	+	+	+
21	Bazo	+	+	+
22	Lnn	+	-	+
23	Bazo	+	+	+
24	Bazo	+	+	+
25	Lnn	+	+	+
26	Lnn	+	-	+
27	Lnn	+	+	+
28	Bazo	-	+	+
29	Lnn	+	+	+
30	Lnn	+	+	+
31	Lnn	-	+	+
32	Bazo	+	+	+
TOTAL +		24	27	31

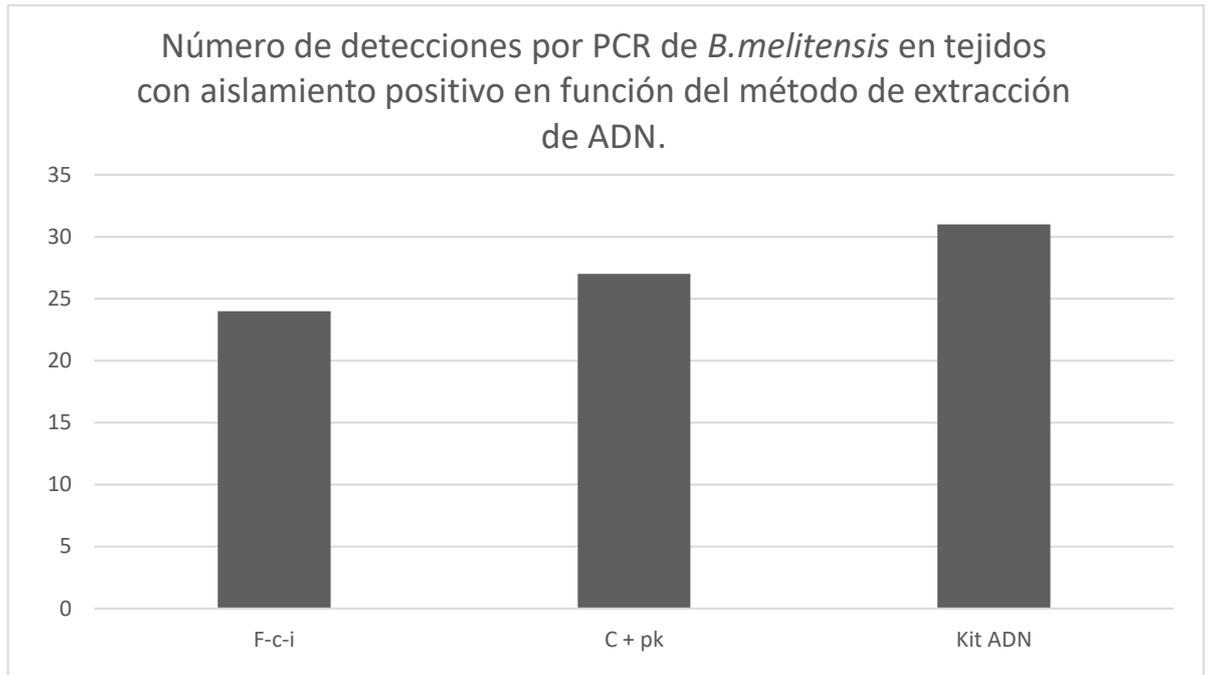


Figura 4. Representación gráfica de la capacidad de detección de PCR en función del método utilizado para la extracción de ADN total de tejidos sobre los cuales se obtuvo previamente aislamiento de *B. melitensis*. F-c-i: Fenol-cloroformo-isoamílico, C + pk: Chelex y proteinasa K, Kit ADN: Kit Comercial

3.4. Detección molecular de *Brucella melitensis*

Se consideró animal positivo a PCR para *B. melitensis* al obtener una banda específica en por lo menos uno de los tejidos provenientes del mismo animal (Figura 5). Luego de la detección molecular de *B. melitensis* en tejidos con aislamiento, se procedió al análisis de muestras de ADN de tejidos de las cuales no fue posible obtener el aislamiento, con lo cual se logró poner en evidencia la presencia del agente en 62 animales (incluyendo los 4 ovinos) (Tabla 12).

La extracción de ADN a partir de linfonódulos fue el tejido sobre el que se obtuvo un mayor número de resultados positivos a PCR (Tabla 12).

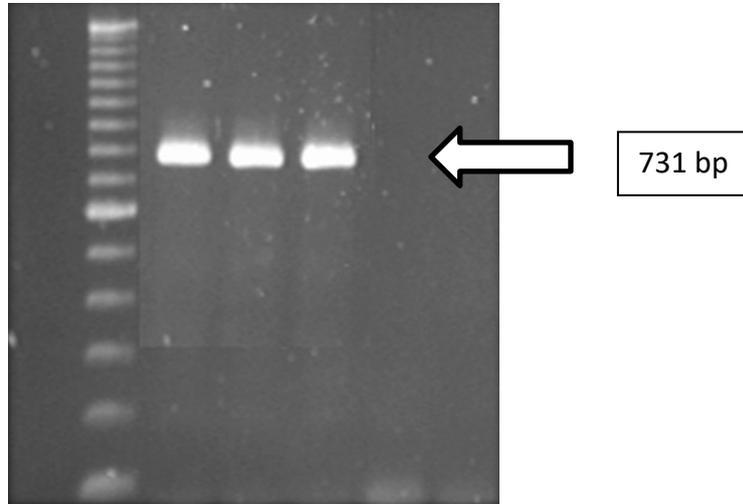


Figura 5. Corrida electroforética teñida con bromuro de etidio obtenida como resultado de la amplificación de *IS711*, mostrando un producto específico de *B. melitensis* de 731 bp

Tabla 12. *B. melitensis* detectadas en tejidos mediante PCR

ID Animal	Tipificación	Localidad	Departamento	Latitud	Longitud	Tejido
6	<i>B. melitensis</i>	Chimborazo	Belgrano	32°28'35.06"S	66°41'25.25"O	Lnn
7	<i>B. melitensis</i>	Chimborazo	Belgrano	32°28'35.06"S	66°41'25.25"O	Lnn
8	<i>B. melitensis</i>	La Represita	Ayacucho	32°10'58.80"S	65°41'60.00"O	Lnn
9	<i>B. melitensis</i>	La Cañada	Ayacucho	32°25'7.81"S	66°39'31.86"O	Lnn
10	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Lnn
11	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Bazo
12	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Lnn
13	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Lnn
14	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Lnn
17	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Bazo
18	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'35.79"S	66°33'40.22"O	Lnn
19	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'35.79"S	66°33'40.22"O	Testículo
20	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'35.79"S	66°33'40.22"O	Lnn
21	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Lnn
22	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	Lnn
25	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	Lnn
26	<i>B. melitensis</i>	Bella Vista	Ayacucho	32°18'34.29"S	66°34'40.12"O	Bazo
27	<i>B. melitensis</i>	Bella Vista	Ayacucho	32°18'34.29"S	66°34'40.12"O	Bazo
28	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°14'19.32"S	66°14'9.83"O	Lnn
31	<i>B. melitensis</i>	Chimborazo	Belgrano	32°29'5.79"S	66°40'42.46"O	Lnn
32	<i>B. melitensis</i>	La Pampa Grande	Ayacucho	32°19'12.49"S	66°34'38.00"O	Bazo
33	<i>B. melitensis</i>	La Pampa Grande	Ayacucho	32°19'12.49"S	66°34'38.00"O	Bazo
37	<i>B. melitensis</i>	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	Lnn
38	<i>B. melitensis</i>	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	Lnn
39	<i>B. melitensis</i>	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	Lnn
42	<i>B. melitensis</i>	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Lnn
43	<i>B. melitensis</i>	Cabeza de Novillo	San Martin	32°22'59.42"S	65°23'58.20"O	Lnn
44	<i>B. melitensis</i>	La Calera	Belgrano	32°53'52.16"S	66°49'35.88"O	Lnn
45	<i>B. melitensis</i>	La Calera	Belgrano	32°53'52.16"S	66°49'35.88"O	Lnn
48	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'11.45"S	66°34'45.75"O	Lnn
49	<i>B. melitensis</i>	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Lnn
50	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Lnn
51	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Lnn
59	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°13'15.58"S	66°34'22.63"O	Lnn
60	<i>B. melitensis</i>	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	Lnn
61	<i>B. melitensis</i>	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	Lnn
62	<i>B. melitensis</i>	Bajada Grande	Belgrano	32°46'33.03"S	67° 4'31.27"O	Lnn
65	<i>B. melitensis</i>	Chimborazo	Belgrano	32°28'35.06"S	66°41'25.25"O	Lnn
67	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°14'19.32"S	66°14'9.83"O	Bazo
68	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°14'19.32"S	66°14'9.83"O	Lnn
70	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°14'19.32"S	66°14'9.83"O	Lnn
71	<i>B. melitensis</i>	Cabeza de Novillo	San Martin	32°22'59.42"S	65°23'58.20"O	Lnn
72	<i>B. melitensis</i>	Cabeza de Novillo	San Martin	32°22'59.42"S	65°23'58.20"O	Lnn
74	<i>B. melitensis</i>	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Lnn
76	<i>B. melitensis</i>	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Lnn
77	<i>B. melitensis</i>	El Ramblon	Belgrano	33° 0'34.54"S	66°58'18.59"O	Lnn
79	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Lnn
80	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Lnn
81	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Lnn
83	<i>B. melitensis</i>	Alto Pencoso	Pueyrredon	33°27'56.06"S	67° 0'31.29"O	Lnn
85	<i>B. melitensis</i>	Alto Pencoso	Pueyrredon	33°27'56.06"S	67° 0'31.29"O	Bazo
87	<i>B. melitensis</i>	La Calera	Belgrano	32°53'52.16"S	66°49'35.88"O	Bazo
88	<i>B. melitensis</i>	La Calera	Belgrano	32°53'52.16"S	66°49'35.88"O	Bazo
89	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Lnn
90	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	Lnn
91	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	Lnn
92	<i>B. melitensis</i>	Cabeza de Novillo	San Martin	32°22'59.42"S	65°23'58.20"O	Lnn
93	<i>B. melitensis</i>	Villa de la Quebrada	Belgrano	33° 1'24.97"S	66°19'9.77"O	Lnn
94	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Lnn
95	<i>B. melitensis</i>	La Botija	Ayacucho	32°14'54.41"S	66°34'47.68"O	Lnn
96	<i>B. melitensis</i>	El Baldecito	Ayacucho	32°15'29.98"S	66°12'38.06"O	Testículo
97	<i>B. melitensis</i>	Alto Pencoso	Pueyrredon	33°27'56.06"S	67° 0'31.29"O	Bazo

3.5. Diversidad de los marcadores VNTR analizados mediante MLVA 16 sobre ADN de proveniente de aislamientos de *B. melitensis*

La técnica MLVA 16 tuvo un poder discriminatorio global de 0.9164. Cada uno de los marcadores analizados aportó su poder discriminatorio como se muestra en la tabla 13, excepto el marcador Bruce45 dado que presentó una sola variante alélica en todas las muestras.

El mayor IDHG lo tuvieron los marcadores Bruce09 y Bruce21, con valores alrededor de 0.7 (Figura 6). Las alternativas alélicas fueron 6 para el marcador de mayor discriminación.

Tabla 13: Índice de Diversidad de Hunter-Gaston (IDHG) para cada uno de los marcadores

Marcador	Índice de Diversidad (*)	Intervalo de Confianza (*1)	K ^(*2)	max(pi) ^(*3)
Bruce09	0,702	0,656 - 0,717	6	0,333
Bruce21	0,699	0,673 - 0,714	4	0,428
Bruce07	0,643	0,635 - 0,665	5	0,476
Bruce30	0,623	0,612 - 0,641	5	0,523
Bruce18	0,602	0,578 - 0,622	5	0,523
Bruce16	0,598	0,574 - 0,623	3	0,476
Bruce11	0,45	0,417 - 0,489	2	0,571
Bruce42	0,412	0,389 - 0,429	2	0,619
Bruce19	0,341	0,321 - 0,352	3	0,714
Bruce04	0,273	0,259 - 0,320	2	0,714
Bruce43	0,254	0,211 - 0,313	2	0,809
Bruce12	0,228	0,177 - 0,279	3	0,857
Bruce55	0,112	0,070 - 0,154	2	0,857
Bruce06	0,096	0,063 - 0,162	2	0,904
Bruce08	0,096	0,063 - 0,162	2	0,904
Bruce45	0	0,000 - 0,081	1	1

(*) **Índice de Diversidad**: Medida de variación del número de repeticiones de cada locus, rango desde 0 (sin diversidad) hasta 1 (máxima diversidad). (*1) **Intervalo de Confianza**: Precisión del índice de diversidad, expresado como límites superior e inferior del 95%. (*2) **K**: Número de diferentes repeticiones presentes para este locus, en este set de muestras. (*3) **Máx.(pi)**: Fracción de muestras que tienen el número de repetición más frecuente en este locus (rango 0.0 a 1.0).

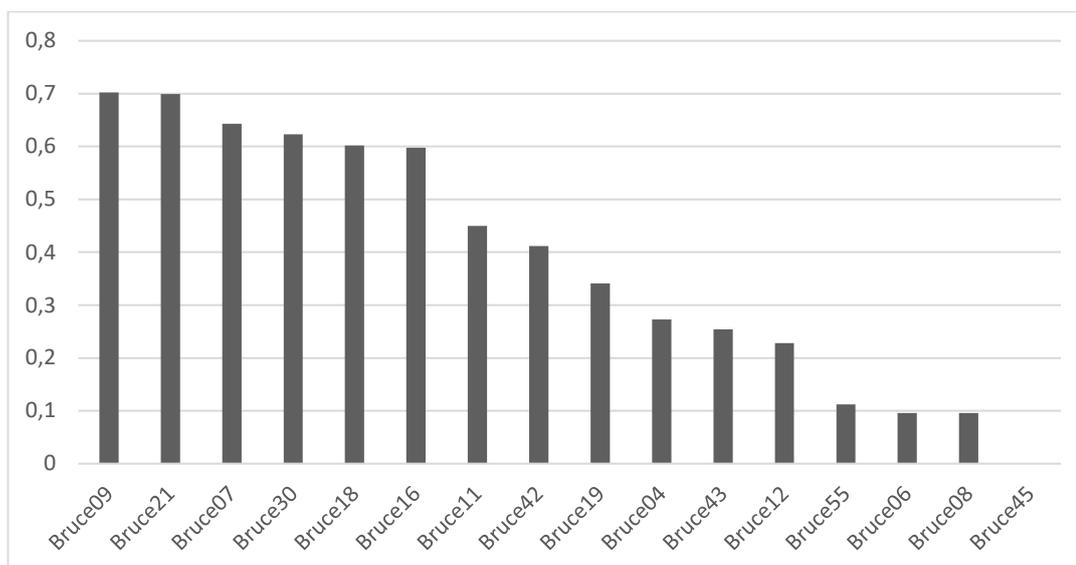


Figura 6: Índice de discriminación de Hunter Gaston para cada uno de los marcadores utilizados sobre ADN de aislamientos.

3.6. Genotipos circulantes de *B. melitensis*

A partir del análisis de los 32 aislamientos se identificaron 21 genotipos diferentes. En el departamento Belgrano se describieron 9 genotipos distintos y en el departamento Ayacucho 8 genotipos bien diferenciados. En los departamentos Pueyrredón y San Martín se individualizaron 3 y 1 genotipos, respectivamente.

La técnica marcó 2 conglomerados o *clusters* bien definidos (Figura 7), separando los genotipos obtenidos del departamento Pueyrredón del resto de los aislamientos (conglomerado 2). A su vez, los genotipos de *B. abortus* utilizados como control se mantuvieron en un conglomerado aparte (cepa *B. abortus* 2308 y *B. abortus* S19).

En su mayoría, los genotipos tuvieron una aparición única ($15/21 = 71.5\%$).

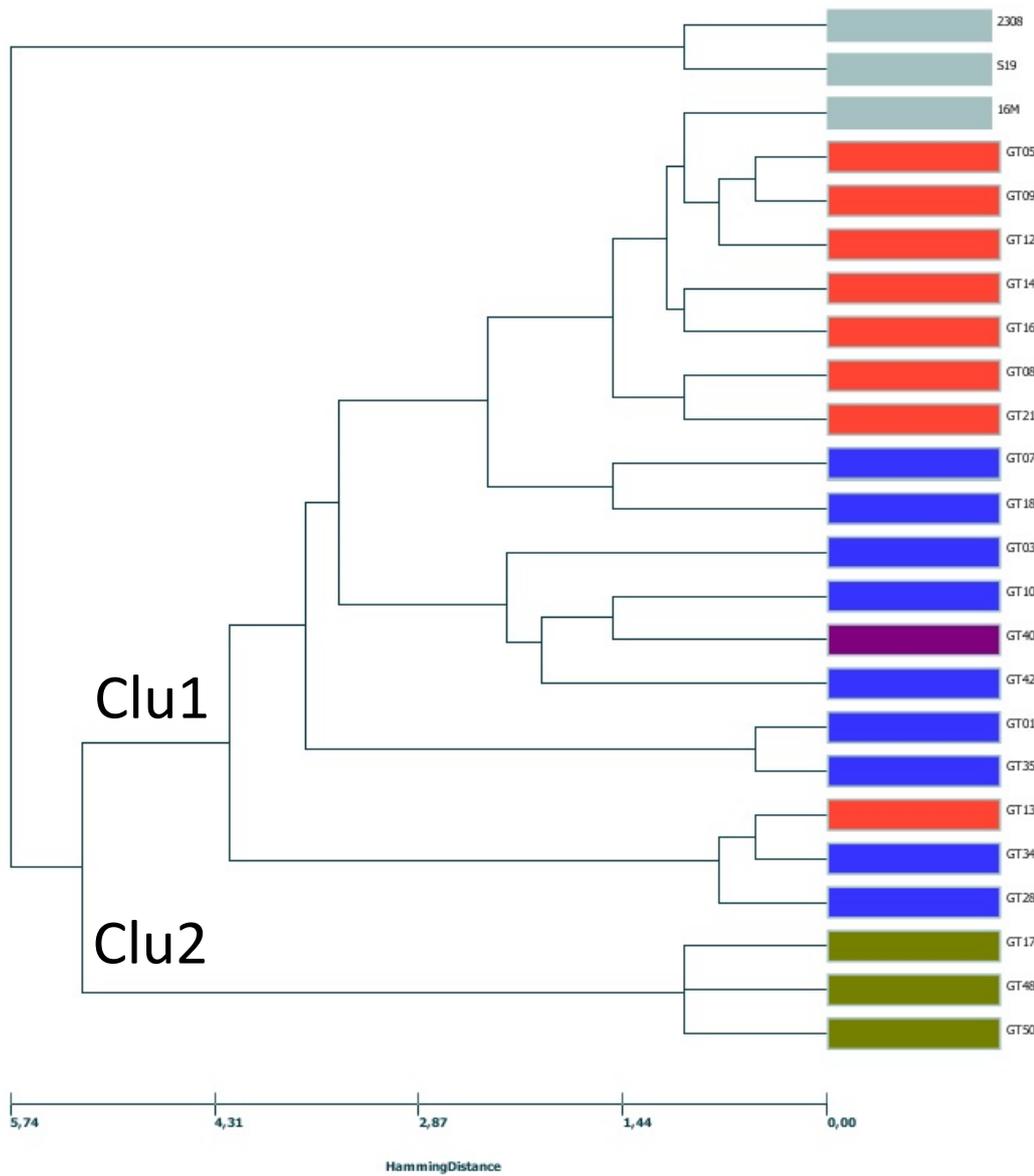


Figura 7: Dendrograma correspondiente al análisis de los genotipos de los aislamientos arrojados por MLVA 16. Los colores representan diferentes departamentos. Clu1 y Clu2 corresponde a la identificación de 2 clusters bien diferenciados. El departamento del cual provienen las muestras se diferencia con diferente color.

3.7. Análisis de la relación genética de *B. melitensis* aisladas de la Provincia de San Luis

Se determinó la existencia de una relación en forma de complejos clonales a partir de genotipos probablemente fundadores. El algoritmo muestra dentro de los genotipos obtenidos de aislamientos a los genotipos GT40, GT09 y GT17 como posibles candidatos a fundadores centrales (Figura 8). De la misma manera, estos complejos clonales aparecen con una tendencia a demarcarse por las diferentes localizaciones geográficas (Figura 9).

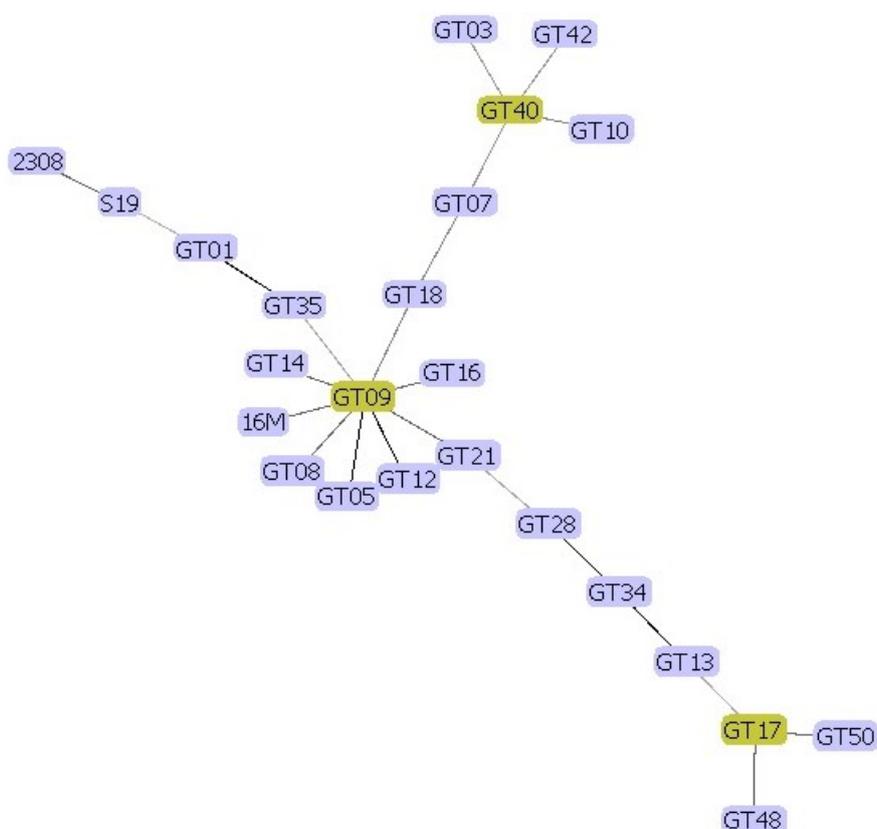


Figura 8: Esquema del complejo obtenido del análisis de 32 cepas de *B. melitensis* aisladas de la Provincia de San Luis. El algoritmo brinda dos posibles tonalidades de grises para los conectores. Los conectores más oscuros brindan la idea de que existen menores diferencias entre los nodos que unen. En el caso de los conectores más claros, permiten visualizar mayores diferencias. En el caso de los colores asignados a los nodos, el color verde claro, marca nodos o núcleos fundadores a partir de los cuales se desprenden nuevos genotipos. Los nodos color celeste, permiten visualizar nodos comunes

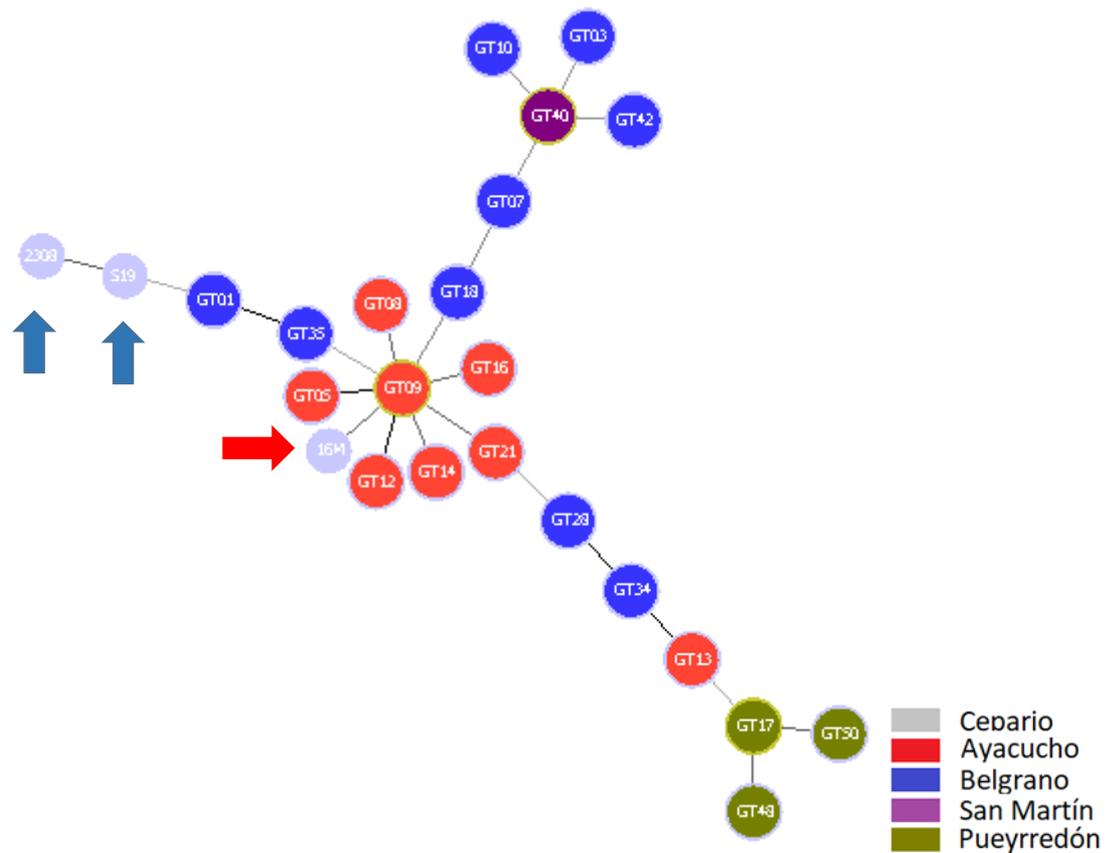


Figura 9: Relación entre los genotipos de *B. melitensis*. (A) 2308 y S19 (flechas azules) corresponden al análisis de MLVA 16 de las cepas *B. abortus* S19 y 2308 respectivamente. 16M corresponde al análisis de *B. melitensis* 16M (flecha roja).

Se visualiza la separación de un grupo de genotipos pertenecientes al departamento Pueyrredón que se aleja del resto, conformando un nodo a partir del GT17. También se aprecia una gran concentración de genotipos del departamento Ayacucho, conformando un nodo.

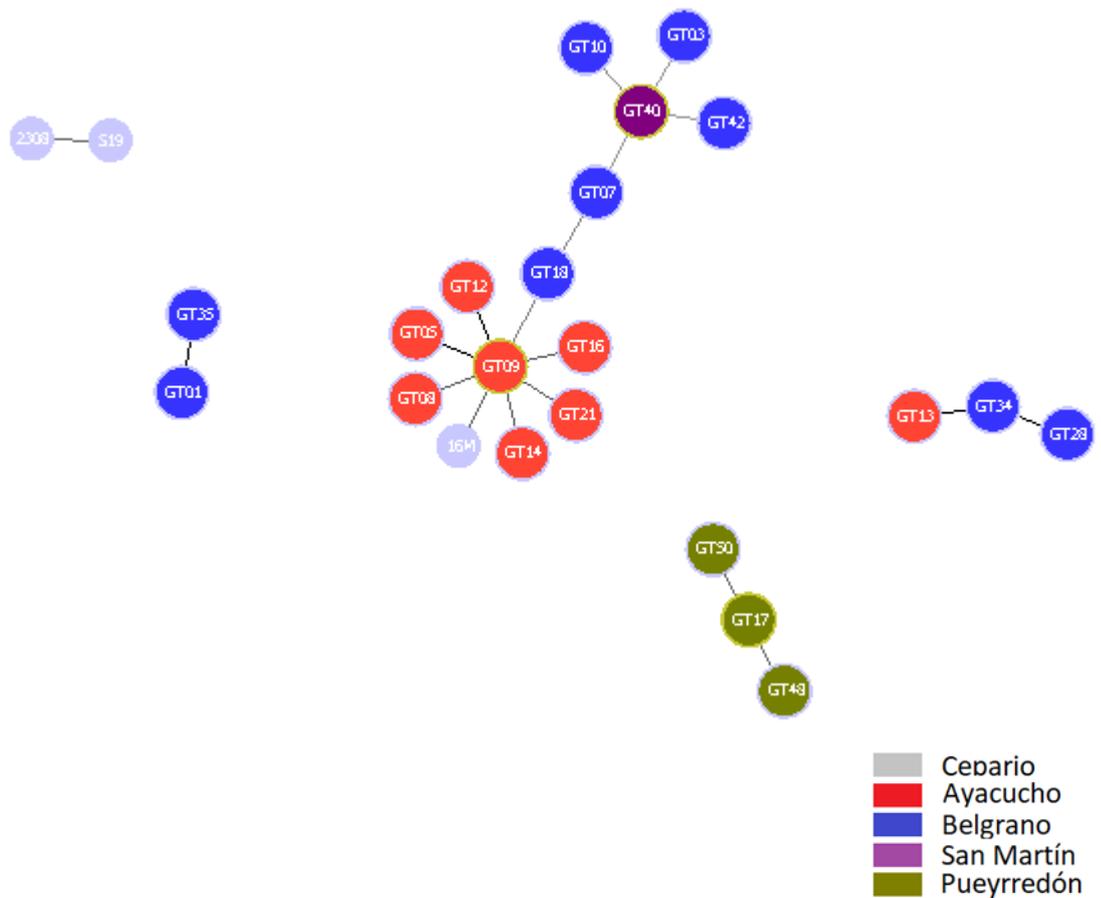


Figura 10: Relación entre los genotipos obtenidos del análisis de 32 aislamientos de la Provincia de San Luis. Gráfico generado por el algoritmo goeBURST que elimina las uniones más débiles entre los genotipos, permitiendo la separación y libre formación de grupos, manteniendo unidos exclusivamente los genotipos altamente relacionados.

Si permitimos al programa PHYLOViZ que elimine las uniones más débiles entre los distintos genotipos se puede ver la conformación de conglomerados o grupos de genotipos altamente relacionados. El conglomerado conformado por los genotipos provenientes de Pueyrredón se separa completamente, se consolida fuertemente un grupo de genotipos asentados en el departamento Ayacucho que podría ser el responsable de la dispersión de genotipos hacia otros departamentos como Belgrano y San Martín (Figura 10).

Se evidencian también genotipos que se encuentran presentes en localidades pertenecientes a diferentes departamentos, como es el caso del genotipo GEN13 que se encontró presente en “La Botija”, partido de Ayacucho, y en “Bajada Grande” partido de Belgrano (Tabla 14). La cantidad de genotipos obtenidos estuvo en una relación directa con la cantidad de muestras procesadas. El genotipo llamado GT09 tuvo aparición en 4 aislamientos bacterianos, 3 de ellos provenientes de la localidad de “La Botija” (Tabla 14). De la misma manera, aparecen descritos en la misma localización diferentes genotipos, como el caso de GT01 y GT07, ambos en la misma localización de muestreo “El Chimborazo”. También, “La Botija”, “Alto Pencoso” y “Bajada Grande” poseen descrito más de un genotipo (Tabla 14).

En el mapa de la zona norte de la Provincia de San Luis (Figura 10) se visualiza la ubicación de los genotipos considerados fundadores mediante la utilización del algoritmo goeBURST.

Tabla 14. Genotipos de *B. melitensis* descritos, su localización

Genotipo	Localidad	Departamento
GT01	Chimborazo 2	Belgrano
	Chimborazo 2	Belgrano
GT03	Villa de la Quebrada	Belgrano
GT05	La Botija 3	Ayacucho
	La Botija 3	Ayacucho
GT07	Chimborazo 2	Belgrano
	Chimborazo 2	Belgrano
GT08	La Pampa Grande	Ayacucho
GT09	La Botija 2	Ayacucho
	La Botija 2	Ayacucho
	La Botija 2	Ayacucho
	El Baldecito II	Ayacucho
GT10	Bajada Grande	Belgrano
	Bajada Grande	Belgrano
	Bajada Grande	Belgrano
GT12	La Botija 5	Ayacucho
	La Botija 5	Ayacucho
GT13	La Botija 2	Ayacucho
	La Botija 2	Ayacucho
	Bajada Grande	Belgrano
GT14	El Baldecito I	Ayacucho
GT16	El Baldecito II	Ayacucho
GT17	Alto Pencoso	Pueyrredón
GT18	El Balde	Belgrano
GT21	La Botija 1	Ayacucho
GT28	El Ramblon	Belgrano
GT34	Bajada Grande	Belgrano
GT35	Chimborazo 2	Belgrano
GT40	Cabeza de Novillo	San Martín
GT42	El Ramblón	Belgrano
GT48	Alto Pencoso	Pueyrredón
GT50	Alto Pencoso	Pueyrredón
Referencia	2308 Ref.	Cepario
Referencia	16M Ref.	Cepario
Vacunal	S19 Vacunal	Cepario

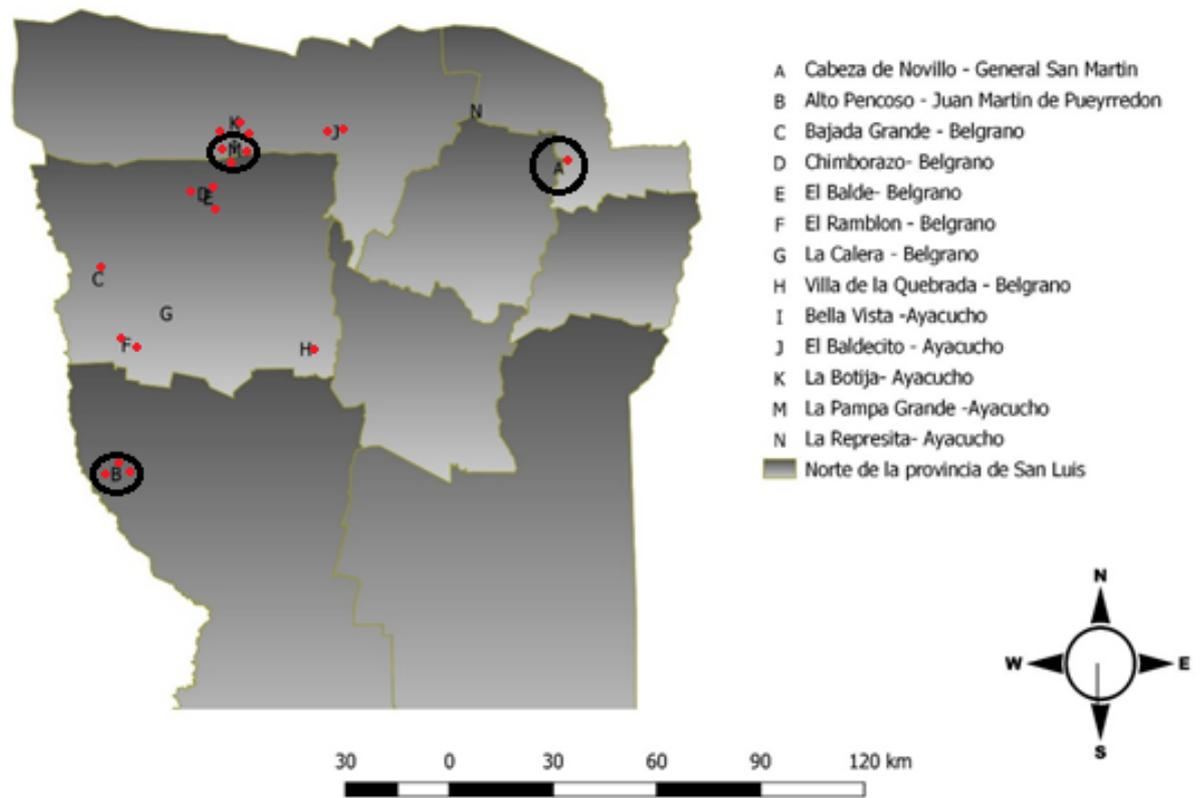


Figura 10. Mapa de los departamentos abarcados el presente trabajo. Se marcan en círculos negros la localización de los genotipos considerados fundadores. Las marcas de color rojo corresponden a genotipos vinculados a los fundadores.

3.8. Comparación de los genotipos circulantes con los presentes en bases de datos internacionales

La comparación de los genotipos obtenidos en el presente estudio (Tabla 15) con los descritos en la base de datos, permite confirmar que ninguno ha sido previamente reportado.

Tabla 15: Genotipos encontrados en el presente trabajo, junto con la sucesión de repeticiones de cada locus en orden

GT	Bruce06	Bruce08	Bruce11	Bruce12	Bruce42	Bruce43	Bruce45	Bruce55	Bruce18	Bruce19	Bruce21	Bruce04	Bruce07	Bruce09	Bruce16	Bruce30
2308	4	5	4	12	2	3	3	3	6	43	8	3	7	3	3	5
16M	3	4	2	13	4	2	3	3	5	36	6	2	5	8	3	6
GT01	2	4	2	12	4	2	3	3	9	36	7	2	4	3	3	5
GT03	3	4	3	13	5	3	3	3	8	36	5	2	5	3	4	5
GT05	3	4	2	13	4	2	3	3	8	36	6	2	5	5	3	6
GT07	3	4	2	13	5	2	3	3	7	36	6	2	5	7	4	4
GT08	3	4	3	13	4	2	3	3	8	36	6	2	4	6	3	6
GT09	3	4	2	13	4	2	3	3	8	36	6	2	5	6	3	6
GT10	3	4	3	13	5	2	3	3	6	36	5	2	5	8	6	8
GT12	3	4	2	13	4	2	3	3	8	36	6	2	8	6	3	6
GT13	3	4	2	13	4	2	3	3	4	40	8	4	4	3	6	10
GT14	3	4	2	13	4	2	3	3	8	36	6	2	6	7	3	6
GT16	3	4	2	14	4	2	3	3	8	36	6	2	5	7	3	6
GT17	3	4	3	13	5	3	3	2	4	41	8	4	4	3	4	6
GT18	3	4	2	13	4	2	3	3	7	36	6	2	5	6	8	4
GT21	3	4	2	13	4	2	3	3	8	36	6	2	4	6	4	6
GT28	3	4	2	13	4	2	3	3	8	40	8	4	4	13	6	10
GT34	3	4	2	13	4	2	3	3	4	40	8	4	4	13	6	10
GT35	2	4	2	12	4	2	3	3	9	36	7	2	4	3	3	6
GT40	3	4	3	13	5	2	3	3	6	36	5	2	5	6	4	4
GT42	3	4	3	13	5	2	3	3	8	36	5	2	7	8	3	4
GT48	3	5	3	13	5	3	3	2	4	41	8	4	4	3	3	6
GT50	3	5	3	13	5	3	3	2	8	41	8	4	4	3	4	6
S19	4	5	4	12	2	2	3	3	6	43	8	3	5	3	3	5

Utilizando los todos los genotipos e ingresando información de *B. melitensis* provenientes de la región Mediterránea se puede observar la diferenciación en grupos. Los genotipos en el presente trabajo pertenecen al grupo América, mientras que los genotipos de otras regiones se mantienen alejados (Figura 10).

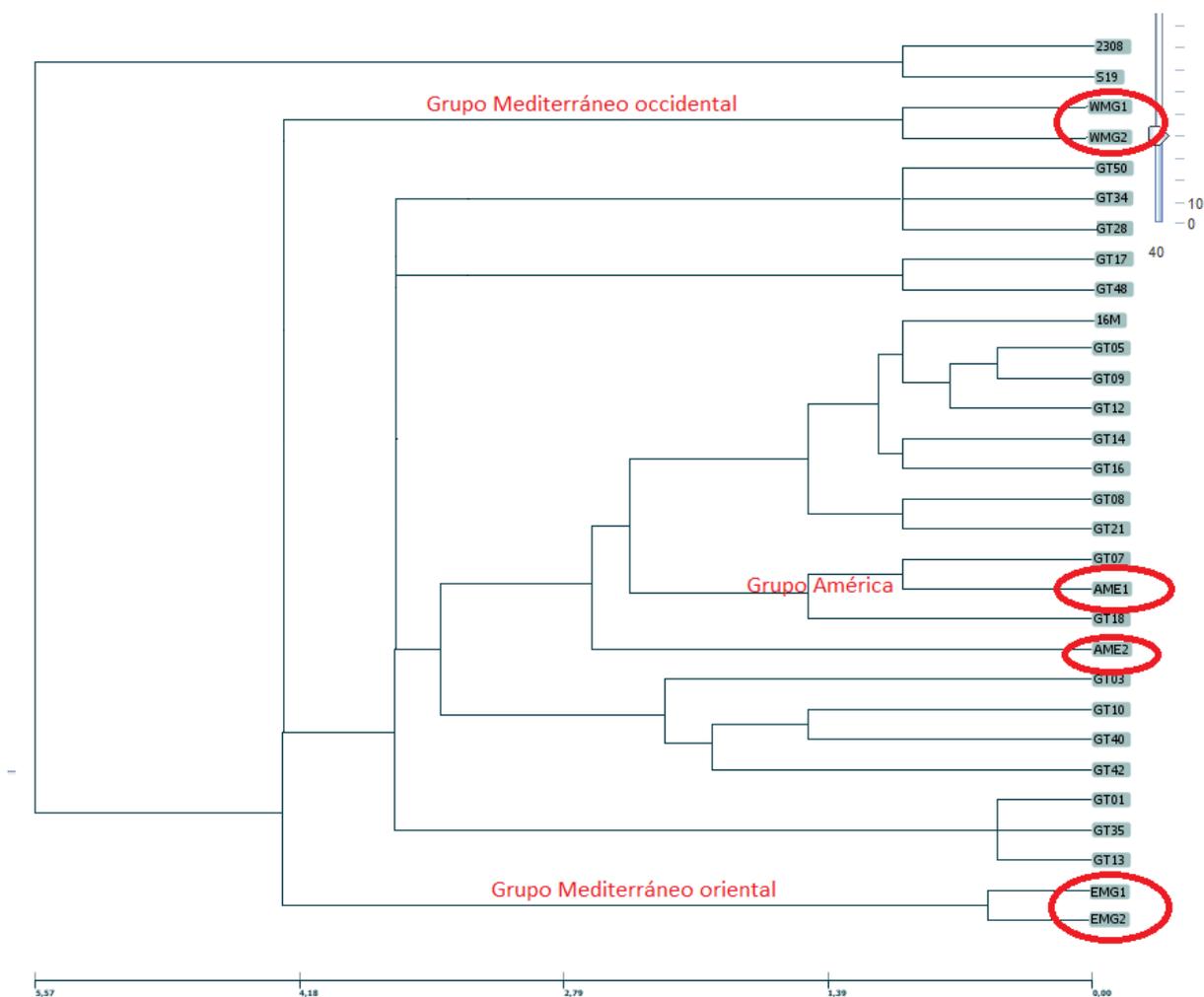


Figura 10. Agrupamientos de genotipos de acuerdo a la región geográfica. 2308: *Brucella abortus*; S19: *Brucella abortus* vacunal; EMG1 y EMG2: genotipos del grupo mediterráneo oriental; AME1 y 2: genotipos del grupo americano; WMG1 y WMG2: genotipos del grupo mediterráneo occidental. GT: genotipos de San Luis.

4. DISCUSIÓN

La brucelosis caprina es un grave problema en Argentina, no sólo en la Provincia de San Luis (SENASA, 2017). La población total de caprinos en el país es de 4.270.000 cabezas (SENASA, 2017) criadas en diversidad de condiciones, pero en un gran número por familias de pequeños productores en regiones de muy bajos ingresos, áridas y marginales del país. Los principales productos que se obtienen de estas explotaciones son la carne y la leche, que se utilizan para la propia alimentación del grupo familiar con venta del remanente.

Con respecto al presente trabajo, la prevalencia de la enfermedad asociada a zonas de bajos recursos de la Provincia de San Luis, muy alejadas de centros urbanos, impide en muchos casos el desarrollo de muestreos en las mejores condiciones. El planteo de un abanico de técnicas para el diagnóstico de brucelosis, brinda alternativas interesantes de acuerdo a las diferentes situaciones epidemiológicas.

La estrategia del MdCdIPdSL para detectar y censar establecimientos productores de caprinos fue la de recorrer, entrevistar y georreferenciar las mismas. El mayor número de establecimientos dentro de la región sobre la cual se trabajó contemplaban explotaciones informales, no registradas, sin instalaciones adecuadas, con animales no identificados. A medida que fue avanzando el programa y el trabajo de tesis, se afianzaron las relaciones con los productores permitiendo muchas veces la llegada a nuevas locaciones previamente desconocidas, donde existía la necesidad de saneamiento (Rodríguez y Delgado, 2016).

La gran mayoría de los establecimientos muestreados fueron explotaciones de subsistencia, crías extensivas destinadas a consumo propio de cabritos y derivados lácteos, con muy escasa tecnificación. Los canales de comercialización de sus productos son precarios. Existe mucho

contacto entre las majadas de establecimientos vecinos. Se practica el encierro nocturno de los animales, pero durante el día permanecen en contacto dado que pastorean en lugares comunes. La costumbre de intercambio y prestamos de animales es usual como así también el robo y la desaparición de animales. La pérdida de caravanas y falta de sistemas de identificación de los animales fueron un problema recurrente durante todo el desarrollo del trabajo.

Actualmente, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria en su Manual de Procedimientos (SENASA, 2019) establece que las pruebas diagnósticas a utilizar en caprinos son BPA como prueba de tamizaje y acepta la utilización de SAT/2ME como pruebas complementarias. De la misma manera, describe la utilización de las pruebas confirmatorias de FPA y FC.

Los resultados obtenidos sugieren que a pesar de las dificultades técnicas que acarrea SAT/2ME (demoras, toxicidad, gran cantidad de material), la utilización combinada en serie junto con BPA en forma inicial, permite lograr una especificidad de hasta 0.986. De acuerdo al manual de procedimientos de SENASA y de trabajos internacionales, las pruebas de FPA y FC alcanzarían una especificidad del 98-99% (Nielsen y Yu, 2010; SENASA, 2019) o inclusive valores menores (Cisterna, 2012).

La imposibilidad de llevar adelante un diseño de muestreo correcto debido al acoplamiento al plan de control y erradicación impidió que se llevaran a cabo algunos de los objetivos propuestos, como ejemplo el análisis correcto de la prevalencia de brucelosis en los diferentes departamentos. De la misma manera, inicialmente se planteó la posibilidad de realizar un análisis más profundo con respecto a la representación de la densidad de aislamientos e

identificar agrupamientos o áreas geográficas de mayor prevalencia, pero el gran valor de las muestras de tejido y complicaciones logísticas llevaron a que las necropsias para la toma de muestras se realizaran por conveniencia y en la medida que fuera posible.

A pesar de las diferentes estrategias planteadas para mejorar la cantidad de los aislamientos bacteriológicos, no se logró obtener un gran número de *B. melitensis*. Las probables razones fueron la contaminación de las muestras, que se tomaron principalmente mediante necropsias a campo, la posible baja carga de microorganismos viables en los tejidos analizados y las demoras en el procesamiento de las muestras. En situaciones normales, la sensibilidad del método bacteriológico varía entre el 30% y el 50% (Alton y col., 1988; Mirnejad y col., 2017).

La utilización de medios selectivos fue la estrategia que permitió disponer de la mayor cantidad de aislamientos bacteriológicos. La inclusión de antibióticos dentro de caldo de enriquecimiento controló gran parte de los contaminantes, que fue uno de los problemas más recurrentes, pero posiblemente haya evitado el crecimiento de *B. melitensis* cuando se encontraba en muy baja carga (OIE, 2016).

Mediante la realización de un test de proporciones, se evidenció que el uso del kit comercial no tuvo diferencias significativas con respecto al desempeño de las otras técnicas de extracción de ADN al momento de detectar el agente de tejidos, pero se escogió por la practicidad, la rapidez y calidad del ADN obtenido.

MLVA revela una estructura con genotipos variados dentro de la población de *B. melitensis* que se encuentra en los departamentos analizados de la Provincia de San Luis. Lograr una asociación entre los genotipos presentes en el ganado y posibles genotipos provenientes de

aislamientos de casos clínicos de humanos podría conformar una meta y un desenlace interesante para el presente trabajo. El plan de control y erradicación de la Provincia de San Luis se afianza inicialmente por la ocurrencia de la enfermedad, específicamente en el departamento Ayacucho, donde se intentó relacionar la presencia de casos en humanos con el diagnóstico de casos en animales (Delgado y col., 2016; Rodríguez y Delgado, 2016).

De la misma manera que la información que brinda MLVA 16 permite identificar a nivel de rodeo diferentes genotipos, es esperable el cuestionamiento de la estabilidad genética de las cepas, ya que la variabilidad y la velocidad de mutación podrían llevar a datos erróneos y dividir un mismo genotipo en genotipos diferentes (Wuyts y col., 2013). Sin embargo, en el año 2013, un grupo de trabajo de Brasil analizó la estabilidad genética de dos cepas vacunales mediante el esquema MLVA 16, las cuales fueron sometidas a pasajes sucesivos (10 pasajes), sin poner en evidencia cambios en sus marcadores moleculares (Dorneles y col., 2013).

En base a trabajos anteriores de diferentes autores al analizar una gran diversidad de cepas de distintas especies de *Brucella*, la técnica puede llegar a presentar limitantes que distorsionen los resultados (Le Flèche y col., 2006), como por ejemplo superponer biovares de diferentes especies, o tener un grado de discriminación muy importante dentro de especies que se encuentran altamente relacionadas. El análisis de los resultados debe realizarse cuidadosamente y utilizar la subtipificación por MLVA como complemento de los estudios epidemiológicos tradicionales y no como único método de tipificación. Por ejemplo, ante un brote de brucelosis, se podría realizar una identificación inicial a nivel especie y/o biovariedad mediante alguno de los esquemas de PCR disponibles (Bricker y Halling, 1995; López-Goñi y col., 2008; Kang y col., 2011; López-Goñi y O'Callaghan, 2012) complementar la información

obtenida mediante bacteriología clásica y luego identificar los genotipos circulantes mediante el análisis de la variabilidad de los VNTRs. Muchas veces, el grado de definición de MLVA 16 puede llegar a generar inconvenientes dado que puede identificar genotipos diferentes dentro de una misma majada, que no necesariamente brindan información epidemiológica de relevancia. El análisis correcto de la relación entre los genotipos, permite poner en evidencia estas capacidades de la técnica (Hollender, 2015).

La técnica básica utilizando solo los primeros 8 marcadores moleculares logra una excelente definición al momento de identificar *Brucella* al nivel de género, como fue demostrado en trabajos de otros autores (Bricker y col., 2003). Debido a la necesidad de lograr una mayor precisión por parte de las técnicas moleculares de subtipificación, es necesario agregar mayor cantidad de marcadores moleculares. La mayor definición, sumado a la información complementaria (por ejemplo, datos de georreferenciación, tipo de explotación, etc.) permite un estudio epidemiológico más exacto y profundo, con capacidad de brindar información de trazabilidad y posible origen de un aislamiento bacteriológico o muestra de ADN (Liu y col., 2017). El estudio de la relación de los genotipos en conjunto con la información geográfica, sugiere que los genéticamente relacionados tienden a presentarse distribuidos en determinadas localizaciones, permitiendo realizar un eventual seguimientos de nuevos casos de brucelosis.

La comparación de los valores de HGDI obtenidos en el presente trabajo en referencia a los valores descritos por otros autores (De Massis y col., 2015), concuerda que la mayor diversidad se encuentra atribuida a los marcadores Bruce09, comprendido en el panel 2B, pero es usual encontrar en las publicaciones en segundo puesto de diversidad al marcador Bruce07 y no al Bruce21 como en el presente trabajo. La gran diversidad se evidencia también

al comparar la frecuencia de aparición de los diferentes alelos para cada locus, lo cual permite concluir una gran homogeneidad observada en el panel 1, lo cual es esperable, ya que todas las muestras analizadas pertenecen a *B. melitensis* y fueron obtenidas en un periodo acotado de tiempo y posiblemente relacionadas genéticamente.

Cabe mencionar, que a pesar de que la mayor diversidad es atribuida a los marcadores del panel 2B, éstos son menores que los que se aprecian en otras publicaciones (valores entre 0.8 y 0.9 para todos los marcadores del panel 2B) y la explicación podría ser un reflejo del tipo de muestreo y aislamientos comprendidos en los diferentes estudios. La mayoría contempla el análisis de ADN proveniente de regiones muy distantes, en ecosistemas muy diferentes y en muchos casos cepas históricas (Al Dahouk y col., 2007; Ferreira y col., 2017; Kang y col., 2017; Liu y col., 2017). En el caso del presente análisis es de destacar que el muestreo se realizó con los animales provenientes de una región acotada y no es un estudio que utiliza aislamientos separados en el tiempo, ni de un cepario sino son las cepas circulantes actualmente, en un periodo comprendido entre 1 y 3 años.

Actualmente no existen publicaciones con respecto al análisis de genotipos circulantes de *Brucella* en Argentina, y muy poco en la región. En la base de datos internacional MLVA Bank for Microbes Genotyping (I2BC, 2018) figura sólo un genotipo de *B. melitensis* de un aislamiento recuperado de humano en Argentina hace más de 10 años y sólo unas pocas caracterizaciones de *B. suis*, *B. abortus* y *B. ovis* (Vergnaud y col., 2018).

A nivel internacional, diferentes grupos de trabajo abordan la temática y alimentan la base de datos con la información de los genotipos obtenidos mediante MLVA de *Brucella*. Pero a pesar de los esfuerzos realizados, en una muy pequeña proporción (Ali y col., 2019) se describe la

obtención de genotipos de cepas circulantes contemporáneas al momento del análisis. Los estudios realizados sobre cepas históricas son válidos y demuestran la validez de la técnica, pero la información epidemiológica que arrojan no permitiría hacer análisis exhaustivos, ni establecer asociaciones epidemiológicas con casos en humanos o circulación de las cepas.

Las especies de *Brucella* se caracterizan por su muy alto nivel de similitud genética, a pesar de la amplia diversidad de hospedadores de preferencia, su virulencia y su patogenicidad (Scholz y col., 2018). El análisis de VNTR permite la discriminación sobre microorganismos muy estrechamente relacionados, con una muy limitada diversidad genética. Esta capacidad es de un gran valor para *Brucella*, dado que posee herramientas de tipificación muy rudimentarias (Lucero y col., 2010).

Desafortunadamente, para los genotipos descritos en este trabajo no se pudo establecer la conexión epidemiológica con casos humanos, aunque no se descarta a futuro poder comparar una base de datos representativa de genotipos obtenidos a partir de casos clínicos. El gran nivel de definición y diferenciación de agrupamientos, y su asignación a áreas geográficas determinadas brinda una gran información que justifica la utilización de la herramienta para alimentar una base de datos comparativa que permita disponer de la información necesaria rápidamente en caso de brotes de la enfermedad. Los hallazgos concuerdan con anteriores publicaciones (Marianelli y col., 2007; Kang y col., 2009; Smits y col., 2009) en los cuales la técnica demuestra ser efectiva y logra una muy buena discriminación y heterogeneidad en los perfiles de VNTR en áreas endémicas delimitadas, inclusive al momento de reconocer las

fuentes de infección comunes en brotes de dicha enfermedad (Sun y col., 2016; Liu y col., 2017).

La medición de la diversidad genotípica en una población es de particular importancia dado que puede reflejar diferencias en la virulencia (Lucero y col., 2010; Hollender y col., 2013) o variantes fenotípicas, como susceptibilidad diferente a antimicrobianos (Shevtsov y col., 2017; Johansen y col., 2018).

La implementación en el análisis de un mayor número de marcadores, tiene un gran incremento del tiempo de procesamiento y costo de reactivos, pero se traduce en un incremento significativo del poder de discriminación del esquema empleado.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, existen una variedad de genotipos distribuidos, inclusive que se describen en localidades pertenecientes a diferentes departamentos (GT13, presente en la localidad de La Botija y Bajada Grande, de los departamentos de Ayacucho y Belgrano respectivamente). El muestreo no fue realizado en forma aleatoria, sino que se obtuvieron las muestras de tejidos por conveniencia, de acuerdo a la aparición de serologías positivas. Se realizó de esa manera dado el gran valor de las muestras, que el estudio se encuentra contemplado dentro del marco de un plan de control y erradicación y el gran costo asociado a la distancia y la logística de la toma y transporte de las muestras.

El esquema de MLVA no solo se utiliza para el análisis de aislamientos de *Brucella*; es una técnica descrita para la evaluación de genotipos de otras bacterias como *Bacillus anthracis* y *Mycobacterium tuberculosis*. Hace algunos años se analizó el efecto de seleccionar ciertos marcadores de VNTR en un esquema para la tipificación de micobacterias y se observó que el

agrupamiento de los distintos aislamientos depende del número de marcadores que se consideren en el panel (Mears y col., 2015), indicando que hay que proceder con precaución al momento de extraer conclusiones a partir de este tipo de estudios. En el caso de *Brucella*, el ensayo se encuentra estandarizado según el esquema sugerido por Le Flèche y colaboradores, modificado levemente por Al Dahouk y colaboradores. (Le Flèche y col., 2006; Al Dahouk y col., 2007). Existen importantes mejoras que pueden ser aplicadas sobre la técnica, como es el caso de reemplazar los geles de agarosa por electroforesis capilar, secuenciar los amplicones o incluso modernas metodologías que pueden reemplazar la técnica completa, como por ejemplo mediante secuenciación masiva (Tan y col., 2015; Fan y col., 2018) pero se traduce en una técnica mucho más cara, más lenta al momento de generar un resultado fácilmente comparable y con la necesidad de manejar equipos complejos.

Como herramienta epidemiológica, el MLVA 16 ofrece una resolución significativa comparado con los métodos de tipificación convencionales, que generalmente no tienen poder discriminativo más allá del nivel biovariedad (OIE, 2016). Los marcadores que se incluyen en un estudio de MLVA de forma separada no son informativos, son muy variables o muestran un alto nivel de homoplasia, pero la combinación de los marcadores puede generar un alto grado de discriminación. La técnica de MLVA es relativamente sencilla ya que sólo requiere determinar el tamaño del producto de amplificación de la PCR, que puede automatizarse mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ADN (Liu y col., 2017) o procesarse con los métodos de electroforesis tradicionales en geles de agarosa o poliacrilamida, según disponibilidad de recursos técnicos, haciendo al ensayo fácilmente adaptable. Además, permite el fácil intercambio de información entre grupos, mediante la alimentación de bases

de datos en línea MLVA Bank (I2BC, 2018) con los perfiles genotípicos de todos los aislamientos, siguiendo lineamientos estandarizados para la ejecución de MLVA 16.

El uso de marcadores VNTR para realizar estudios filogenéticos y taxonómicos en bacterias es criticado debido a su rápida evolución y a una potencial homoplasia que pueden llevar a conclusiones erróneas (Fu y col., 2016). En especies con carga genética tan similar como *Brucella*, donde es difícil detectar variabilidad por otros métodos, el empleo de VNTRs constituye una alternativa factible de ejecutar.

La tipificación por MLVA de aislamientos animales y humanos revela una estructura en grupos que normalmente se distribuyen geográficamente en zonas bastante estables (Nockler y col., 2009). Por ejemplo, aislamientos humanos de *B. melitensis* en Europa y África pueden ser agrupados de acuerdo a su origen geográfico en grupo Mediterráneo oriental y grupo Mediterráneo occidental. Dentro del Mediterráneo occidental (que incluye aislamientos de Francia, Suiza, Túnez y Argelia), se diferencia el agrupamiento descrito a partir de aislamientos de Italia, a pesar de la cercanía geográfica (Al Dahouk y col., 2007). Como se mencionó previamente, en Argentina, existen muy escasos antecedentes de la aplicación de metodologías de tipificación basadas en MLVA 16 de *B. melitensis* tanto en el ámbito humano, como veterinario, por lo tanto, se desconoce la estructura genética de las cepas circulantes en nuestro país. Entonces, el empleo de MLVA 16 durante el desarrollo del presente trabajo de tesis, constituye un trabajo pionero en el área, que permitió discriminar una amplia variedad de *B. melitensis* y poner de manifiesto la gran diversidad de genotipos circulantes analizando sólo una acotada área de la Provincia de San Luis.

A través del análisis goeBURST se pudo relacionar a todos los genotipos entre sí y, además, asociarlos con la zona geográfica sobre la cual fueron obtenidos, proponiendo algunos inclusive como fundadores de complejos clonales. La información generada podrá desencadenar nuevas propuestas de manejo de la enfermedad o evidenciar zonas de particular riesgo donde enfocar los esfuerzos de un plan de control y erradicación de la enfermedad que ya se encuentra bien establecido.

5. CONCLUSIONES

- El trabajo de tesis provee información por primera vez en el país de la descripción de genotipos de *Brucella melitensis* en una región endémica de brucelosis.
- En la Provincia de San Luis, en los departamentos donde existe explotación caprina, los genotipos de *Brucella melitensis* se distribuyen respetando una distribución geográfica. Las localidades más cercanas, por el constante contacto entre los animales tienden a retener genotipos altamente relacionados. De la misma manera, la formación de fuertes conglomerados dentro de los departamentos permite describir la estructura de genotipos establecidos en la Provincia de San Luis.
- En nuestro país, en lo que se refiere a *Brucella melitensis*, el foco se encuentra puesto sobre los caprinos, pero de ninguna manera deben excluirse los ovinos. En el presente trabajo se muestra la detección de *B. melitensis* en tejidos ovinos.
- La información generada por el presente trabajo es totalmente extrapolable a otras especies de *Brucella*, por lo que la generación de una base de datos a nivel nacional puede proveer de información vital sobre la cual comparar nuevos aislamientos bacteriológicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Revista Española de Salud Pública. 2005;Bacteriosis y Micosis(3).
2. Aguilera O, Becerra R, Vergés E, Martínez R, S. de Guzmán A, P. de Centorbi O. Relevamiento de la brucelosis caprina en la Provincia de San Luis. Revista Argentina de Microbiología. 1979;11(2):45-8.
3. Ahmed W, Zheng K, Liu ZF. Establishment of Chronic Infection: *Brucella's* Stealth Strategy. Front Cell Infect Microbiol. 2016;6:30.
4. Al Dahouk S, Fleche PL, Nockler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J Microbiol Methods. 2007;69(1):137-45.
5. Al Dahouk S, Kohler S, Occhialini A, Jimenez de Bagues MP, Hammerl JA, Eisenberg T, Vergnaud G, Cloeckart A, Zygmunt MS, Whatmore AM, Melzer F, Drees KP, Foster JT, Wattam AR, Scholz HC. *Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. Sci Rep. 2017;7:44420.
6. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. Clinical laboratory. 2003;49(9-10):487-505.
7. Ali S, Akhter S, Ahmad Khan I, Ahmed H, Maalik A, Neubauer H, Melzer F, El-Adawy H. Molecular Typing of *Brucella abortus* Strains Isolated from Cattle in Different Districts of Pakistan Based on Bruce-Ladder-PCR and MLVA 16 Assays. Pakistan Veterinary Journal. 2019.
8. Alton G, Jones L, Angus R, Verger J. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, Francia: Institut National de la Recherche Agronomique; 1988.
9. Analytical. Statistix 10. Analytical Software; 2019.
10. Arregui M, Samartino L. MLVA 16 para la genotipificación de *Brucella melitensis* a partir de tejidos caprinos y ovinos provenientes de la Provincia de San Luis. XXI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio Diagnóstico AAVLD. 2016.

11. Artenstein AW. Bioterrorism and Biodefense. Infectious Diseases (Fourth Edition). 2017:670-9.
12. Baumgarten D. Brucellosis : a short review of the disease situation in Paraguay. Veterinary Microbiology. 2002;90:63-9.
13. Bowden RA, Baldi PC, Cassataro J, Comerci DJ, Estein S, Carlos A, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Wallach JC. *Brucella*. In: Stanchi N, editor. Microbiologia Veterinaria. Buenos Aires: InterMedica; 2007. p. 389-405.
14. Bricker B, Ewalt D, Halling S. *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiololy. 2003;3(15).
15. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the Brucella AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. Journal of Clinical Microbiology. 1995;33(6):1640-2.
16. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, Evirgen O, Akdeniz H. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. Int J Infect Dis. 2010;14(6):e469-78.
17. Byndloss MX, Tsolis RM. *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. Annu Rev Anim Biosci. 2016;4:111-27.
18. Carvalho Neta AV, Mol JP, Xavier MN, Paixao TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of bovine brucellosis. Vet J. 2010;184(2):146-55.
19. Casalis V. SENASA Oficina Villa Mercedes CR La Pampa- San Luis.2013.
20. Castano MJ, Solera J. Chronic brucellosis and persistence of DNA. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2084-9. *Brucella melitensis*
21. Castaño MJ, Navarro E, Solera J. Brucellosis. International Encyclopedia of Public Health. 2017;1:281-95.
22. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med. 2003;198(4):545-56.

23. Ciftci A, Ica T, Savasan S, Sareyyupoglu B, Akan M, Diker KS. Evaluation of PCR methods for detection of *Brucella* strains from culture and tissues. *Trop Anim Health Prod.* 2017;49(4):755-63.
24. Cisterna C. Comparación de técnicas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis en caprinos. Universidad de Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2012.
25. Copin R, Vitry MA, Hanot Mambres D, Machelart A, De Trez C, Vanderwinden JM, Magez S, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002575.
26. Corbel MJ. *Brucellosis in humans and animals.* Geneva: World Health Organization, 2006.
27. Cruz ML, Wilde O, de la Vega A, Samartino LE. El Test Elisa en el diagnóstico de la Brucelosis Caprina en el NOA. *Veterinaria Argentina.* 2002;19(188):576-80.
28. De Bolle X, Crosson S, Matroule JY, Letesson JJ. *Brucella abortus* Cell Cycle and Infection Are Coordinated. *Trends Microbiol.* 2015;23(12):812-21.
29. De Massis F, Garofolo G, Camma C, Ippoliti C, Candeloro L, Ancora M, Calistri P. Genetic characterization of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* geographical clusters in Italy. *Vet Ital.* 2015;51(3):225-33.
30. De Miguel MJ, Marin CM, Munoz PM, Dieste L, Grillo MJ, Blasco JM. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1458-63.
31. Dean AS, Crump L, Greter H, Hattendorf J, Schelling E, Zinsstag J. Clinical manifestations of human brucellosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1929.
32. Delgado M, Arregui M, Navarro M, Spina M, Rey J, Garro C, Rodriguez C, Samartino L. Descripción de un brote de brucelosis caprina, a partir de un brote en humanos. Libro de Resúmenes XX Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio Diagnóstico (AAVLD). 2016;1.
33. Delgado MG, Spina MJ, Martorell G, Rodriguez ME. Brucelosis caprina: determinación de la prevalencia en el departamento Belgrano (Provincia de San Luis) Libro de Resúmenes XIX

Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio Diagnóstico (AAVLD). 2012;1:E7.

34. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(1):443-8.

35. Doganay M, Aygen B. Brucellosis: and overview. Internationan Journal of Infectious Diseases. 2003;7(3):173-82.

36. Dorneles EM, de Faria AP, Pauletti RB, Santana JA, Caldeira GA, Heinemann MB, Titzede-Almeida R, Lage AP. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). Vaccine. 2013;31(42):4856-9.

37. Dorneles EM, Teixeira-Carvalho A, Araujo MS, Sriranganathan N, Lage AP. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. Vaccine. 2015;33(31):3659-66.

38. Dirección Provincial de Epidemiología y Censos. Informe de Salud. Provincia de San Luis. San Luis: Gobierno de la provincia de San Luis, 2011.

39. Ducrotoy MJ, Munoz PM, Conde-Alvarez R, Blasco JM, Moriyon I. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. Prev Vet Med. 2018;151:57-72.

40. El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 2018;6:S31-S5.

41. Epidemiología. Brucelosis, Guia para los Equipos de Salud. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud, 2013.

42. Fan S, Ren H, Wei Y, Mao C, Ma Z, Zhang L, Wang L, Ge Y, Li T, Cui L, Wu H, Guan H. Next-generation sequencing of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of neurobrucellosis. Int J Infect Dis. 2018;67:20-4.

43. Ferreira AC, Correa de Sa MI, Dias R, Tenreiro R. MLVA 16 typing of *Brucella suis* biovar 2 strains circulating in Europe. Vet Microbiol. 2017;210:77-82.

44. Franc KA, Krecek RC, Hasler BN, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health*. 2018;18(1):125.
45. Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC bioinformatics*. 2009;10:152-.
46. Fu S, Octavia S, Wang Q, Tanaka MM, Tay CY, Sintchenko V, Lan R. Evolution of Variable Number Tandem Repeats and Its Relationship with Genomic Diversity in *Salmonella Typhimurium*. *Front Microbiol*. 2016;7:2002.
47. Garin-Bastuji B, Blasco J-M. Pathogens in Milk: *Brucella* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2016.
48. Garofolo G, Di Giannatale E, De Massis F, Zilli K, Ancora M, Camma C, Calistri P, Foster JT. Investigating genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Italy with MLVA 16. *Infect Genet Evol*. 2013;19:59-70.
49. Geresu M, Kassa G. A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. *Journal of Veterinary Science & Technology*. 2016;07(03).
50. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res*. 2005;36(3):313-26.
51. Godfroid J, Garin-Bastuji B, Saegerman C, Blasco JM. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 2013;30(1):27-42.
52. Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letesson JJ. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med*. 2011;102(2):118-31.
53. González Tomé JS, Saraví M, Samartino LE. "Tormenta" de abortos en un establecimiento caprino causada por *Brucella melitensis*. *Revista Veterinaria Argentina*. 1995;12(112):89-94.

54. Goobar J, Balter M, Maubecin R, Santolaya A. Aspectos epidemiológicos de la brucelosis en la Argentina. Buenos Aires, Argentina: Organización Panamericana de la Salud, 1975.
55. Google. Google Earth Pro. Google; 2019.
56. Guzmán-hernández RL, Contreras-rodríguez A, Daniel E, Rosario Á-cM. Brucelosis: zoonosis de importancia en México. Revista Chilena de Infectología. 2016;33(6):656-62.
57. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol. 2005;187(8):2715-26.
58. He Y. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:2.
59. Higgins JL, Bowen RA, Gonzalez-Juarrero M. Cell mediated immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence strain Rev. 1. Vet Immunol Immunopathol. 2018;202:74-84.
60. Higgins JL, Gonzalez-Juarrero M, Bowen RA. Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1. PLoS One. 2017;12(10):e0185823.
61. Hollender D. *Brucella abortus*: tipificación molecular por MLVA en aislamientos locales, análisis in silico de sus lipoproteínas e implicancia de las lipoproteínas en virulencia. Universidad de Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2015.
62. Hollender D, Conde SB, Salustio E, Samartino LE. Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador en aislamientos de *Brucella abortus* de Argentina. Rev Argent Microbiol. 2013;45(4):229-39.
63. HPA. Discriminatory Power Calculator. hpa-bioinformatics; 2019; Disponible en <http://hpa-bioinformatics.org.uk>
64. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26(11):2465-6.

65. I2BC. MLVA bank for microbes genotyping University Paris-Saclay; 2018; Disponible en: <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr>
66. Johansen TB, Scheffer L, Jensen VK, Bohlin J, Feruglio SL. Whole-genome sequencing and antimicrobial resistance in *Brucella melitensis* from a Norwegian perspective. *Sci Rep*. 2018;8(1):8538.
67. Kang SI, Her M, Erdenebaatar J, Vanaabaatar B, Cho H, Sung SR, Lee JJ, Jung SC, Park YH, Kim JY. Molecular epidemiological investigation of *Brucella melitensis* circulating in Mongolia by MLVA16. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2017;50:16-22.
68. Kang SI, Her M, Heo EJ, Nam HM, Jung SC, Cho D. Molecular typing for epidemiological evaluation of *Brucella abortus* and *Brucella canis* isolated in Korea. *J Microbiol Methods*. 2009;78(2):144-9.
69. Kang SI, Her M, Kim JW, Kim JY, Ko KY, Ha YM, Jung SC. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6726-8.
70. Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:72.
71. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in Pregnant Women. *Clinical Infectious Diseases*. 2001;32(8):1172-7.
72. Khan MZ, Zahoor M. An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. *Trop Med Infect Dis*. 2018;3(2).
73. Köhler S, Michaux-Charachon S, Porte F, Ramuz M, Liautard J-P. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol*. 2003;11(5):215-9.
74. Kurdoglu M, Orkun C, Zehra K, Hayrettin A. The Effect of Brucellosis on Women's Health and Reproduction. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*. 2015;3(3):126-31.
75. Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(1):45-51.

76. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, Nöckler K, Neubauer H, Guilloteau La, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006;6:9.
77. Liu D. *Brucella*. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology*. Boston: Elsevier Ltd; 2015. p. 1781-8.
78. Liu ZG, Di DD, Wang M, Liu RH, Zhao HY, Piao DR, Tian GZ, Fan WX, Jiang H, Cui BY, Xia XZ. MLVA Genotyping Characteristics of Human *Brucella melitensis* Isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front Microbiol.* 2017;8:6.
79. López-Goñi I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa de Sa MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 2008;46(10):3484-7.
80. López-Goñi I, O'Callaghan D. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Poole, UK: Caister Academic Press; 2012.
81. Lowe CF, Showler AJ, Perera S, McIntyre S, Qureshi R, Patel SN, Allen V, Devlin HR, Muller MP. Hospital-associated transmission of *Brucella melitensis* outside the laboratory. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):150-2.
82. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection.* 2007;136(4):496-503.
83. Lucero NE, Tenenbaum M, Jacob NR, Escobar GI, Groussaud P, Whatmore AM. Application of variable number of tandem repeats typing to describe familial outbreaks of brucellosis in Argentina. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 6):648-52.
84. Mancilla M, Ulloa M, Lopez-Goni I, Moriyon I, Maria Zarraga A. Identification of new IS711 insertion sites in *Brucella abortus* field isolates. *BMC Microbiol.* 2011;11(176):1471-2180.
85. Marianelli C, Graziani C, Santangelo C, Xibilia MT, Imbriani A, Amato R, Neri D, Cuccia M, Rinnone S, Di Marco V, Ciuchini F. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2923-8.
86. Martinez P. Brucellosis humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30(6):653-9.

87. Mears J, Abubakar I, Cohen T, McHugh TD, Sonnenberg P. Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR): A systematic review. *BMJ Open*. 2015;5(1):1-8.
88. Megid J, Mathias L, Robles C. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open Veterinary Science Journal*. 2010;4:119-26.
89. Méndez-Lozano M, Rodríguez-Reyes E, Sánchez-Zamorano L. Brucellosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud Pública de México*. 2015;5(6):529-7.
90. Miller CN, Smith EP, Cundiff JA, Knodler LA, Bailey Blackburn J, Lupashin V, Celli J. A *Brucella* Type IV Effector Targets the COG Tethering Complex to Remodel Host Secretory Traffic and Promote Intracellular Replication. *Cell Host Microbe*. 2017;22(3):317-29 e7.
91. Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Molecular investigation of virulence factors of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains isolated from clinical and non-clinical samples. *Microb Pathog*. 2017;109:8-14.
92. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol*. 2014;5:213.
93. Muñoz J. Plan Caprino. San Luis: Gobierno de la Provincia de San Luis; 2001.
94. Nicola AM, Elena S, Alonso B, Esteves Madero J. Evaluation of the Fluorescence Polarization Assay (FPA) for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats in Argentina. *Prilozi*. 2010;31(1):133-43.
95. Nielsen K, Gall D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2001;22(3):183-201.
96. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi* 2010;31(1):65-89.
97. Nockler K, Maves R, Cepeda D, Draeger A, Mayer-Scholl A, Chacaltana J, Castaneda M, Espinosa B, Castillo R, Hall E, Al Dahouk S, Gilman RH, Cabeza F, Smits HL. Molecular epidemiology of *Brucella* genotypes in patients at a major hospital in central Peru. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3147-55.

98. OIE. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). In: OIE, editor. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para Animales Terrestres. 2016.
99. Olsen SC, Palmer MV. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. Vet Pathol. 2014;51(6):1076-89.
100. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. Cell Mol Life Sci. 2006;63(19-20):2229-36.
101. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. The Lancet Infectious Diseases. 2006;6(2):91-9.
102. Perez-Sancho M, Duran-Ferrer M, Garcia-Seco T, Macias P, Garcia N, Martinez I, Ruiz E, Legaz E, Diez-Guerrier A, Gonzalez S, Dominguez L, Alvarez J. Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. Vet Immunol Immunopathol. 2014;160(1-2):123-8.
103. Pérez-Sancho M, García-Seco T, Domínguez L, Álvarez J. Control of Animal Brucellosis -The Most Effective Tool to Prevent Human Brucellosis. Updates on Brucellosis: IntechOpen; 2015.
104. PHYLOViZ. PHYLOViZ 2.0. 2016; Disponible en: <http://www.phyloviz.net> .
105. Poester FP, Picao Goncalves VS, Pereira Lage A. Brucellosis in Brazil. Veterinary Microbiology. 2002;90:55-62.
106. Poester FP, Samartino LE, Santos RL. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. Revue Scientifique et Technique de l'OIE. 2013;32(1):105-15.
107. QGIS. QGIS Geographic Information System. In: Project OSGF, editor.: QGIS Development Team; 2018.
108. QIAGEN. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Venlo, Holanda: QIAGEN; 2016.
109. Qian C, Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. Semin Immunol. 2018;35:3-11.
110. Rizzo J, Rouchka E. Review of Phylogenetic Tree Construction. University of Louisville Bioinformatics Laboratory Technical Report Series. 2007;01:1-7.

111. Robles C, Gaido A, Spath E, Torioni S, Vanzini V, Zielinski G, Aguirre D, Samartino L, Rossanigo C. Brucelosis caprina en la Argentina. Anguil, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2014.
112. Robles C, Uzal F. Guía práctica de necropsia en ovinos y caprinos. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 1991.
113. Rodríguez ME, Delgado MG. Diagnóstico, prevención y control de patologías de impacto en los sistemas productivos y en la salud pública. San Luis, Argentina: Ministerio de Medio Ambiente, Campo y Producción, Gobierno de San Luis, 2016.
114. Rubach MP, Halliday JE, Cleaveland S, Crump JA. Brucellosis in low-income and middle-income countries. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(5):404-12.
115. Sam I-C, Karunakaran R, Kamarulzaman A, Ponnampalavanar S, Syed Omar SF, Ng KP, Mohd Yusof MY, Hooi PS, Jafar FL, Abubakar S. A large exposure to *Brucella melitensis* in a diagnostic laboratory. *The Journal of hospital infection.* 2012;80(40):321-5.
116. Samartino L, Arregui M, Martino P. New Scenarios for *Brucella suis* and *Brucella melitensis*. *Current Clinical Microbiology Reports.* 2017;4(1):11-8.
117. Scholz HC, Banai M, Cloeckert A, Kämpfer P, Whatmore AM. *Brucella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 2018. p. 1-38.
118. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(Pt 4):801-8.
119. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):392-8.
120. SENASA. Brucelosis. Manual de Diagnóstico Serológico (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*). Buenos Aires, Argentina: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria; 2019.
121. SENASA. Indicadores de Ganadería Caprina. Buenos Aires, Argentina: SENASA, 2017.
122. SENASA. Resolución 372-E/2017. In: SENASA, editor. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Agroindustria, Ganadería y Pesca; 2017.

123. Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, Kairzhanova A, Tarlykov P, Filipenko M, Dymova M, Abisheva G, Jailbekova A, Kamalova D, Chsherbakov A, Tulegenov S, Akhmetova A, Sytnik I, Karibaev T, Mukanov K. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA 16. *Infect Genet Evol.* 2015;34:173-80.
124. Shevtsov A, Syzdykov M, Kuznetsov A, Shustov A, Shevtsova E, Berdimuratova K, Mukanov K, Ramankulov Y. Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* in Kazakhstan. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;6:130.
125. Smits HL, Espinosa B, Castillo R, Hall E, Guillen A, Zevalleta M, Gilman RH, Melendez P, Guerra C, Draeger A, Broglia A, Nockler K. MLVA genotyping of human *Brucella* isolates from Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(4):399-402.
126. Sun MJ, Di DD, Li Y, Zhang ZC, Yan H, Tian LL, Jing ZG, Li JP, Jiang H, Fan WX. Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains currently circulating in Xinjiang, China. *Infect Genet Evol.* 2016;44:522-9.
127. Sung KY, Yoo HS. Host immune responses during *Brucella* infection : A brief review. *Journal of Preventive Veterinary Medicine.* 2014;38(1):26-34.
128. Tae H, Shallom S, Settlege R, Preston D, Adams LG, Garner HR. Revised genome sequence of *Brucella suis* 1330. *J Bacteriol.* 2011;193(22):6410.
129. Tan KK, Tan YC, Chang LY, Lee KW, Nore SS, Yee WY, Mat Isa MN, Jafar FL, Hoh CC, AbuBakar S. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. *BMC Genomics.* 2015;16:93.
130. Tarabla H. Epidemiología diagnóstica. Centro de Publicaciones. Universidad Nacional Del Litoral. 2000
131. Terwagne M, Mirabella A, Lemaire J, Deschamps C, De Bolle X, Letesson JJ. Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS One.* 2013;8(12):e82514.
132. Traxler RM, Lehman MW, Bosserman EA, Guerra MA, Smith TL. A literature review of laboratory-acquired brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):3055-62.
133. UBC. Discriminatory Power Calculator. University of the Basque Country; 2019; Disponile en http://insilico.ehu.eus/mini_tools/discriminatory_power

134. UVITEC. UVISOFT image acquisition and analysis software. Cambridge, United Kingdom: UVITEC; 2010.
135. van Helden PD, van Helden LS, Hoal EG. One world, one health. Humans, animals and the environment are inextricably linked--a fact that needs to be remembered and exploited in our modern approach to health. *EMBO reports*. 2013;14(6):497-501.
136. Vargas FJ. Brucellosis in Venezuela. *Veterinary Microbiology*. 2002;90:39-44.
137. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(5):760-4.
138. Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, Cloeckert A, Zygmunt MS. Genotypic Expansion Within the Population Structure of Classical Brucella Species Revealed by MLVA16 Typing of 1404 *Brucella* Isolates From Different Animal and Geographic Origins, 1974-2006. *Front Microbiol*. 2018;9:1545.
139. Wallach JC, Samartino LE, Efron A, Baldi PC. Human infection by *Brucella melitensis*: an outbreak attributed to contact with infected goats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1998;19:315-21.
140. Whatmore AM, Davison N, Cloeckert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz HC, Dick EJ, Jr., Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch NE. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt 12):4120-8.
141. Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ, MacMillan AP. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):1982-93.
142. Wuyts V, Mattheus W, de Bex GDL, Wildemauwe C, Roosens N, Marchal K, De Keersmaecker S, Bertrand S. MLVA as a Tool for Public Health Surveillance of Human *Salmonella Typhimurium* : Prospective Study in Belgium and Evaluation of MLVA Loci Stability. *PLoS ONE*. 2013;8(12).
143. Wyatt HV. Brucellosis and Maltese goats in the Mediterranean. *Journal of Maltese History*. 2009;1(2):4-18.

144. Young EJ. *Brucella* Species (Brucellosis). Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 2018:886-9.
145. Yu WL, Nielsen K. Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. Croatian Medical Journal. 2010;51(4):306-13.
146. Zhang N, Huang D, Wu W, Liu J, Liang F, Zhou B, Guan P. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: A systematic review of experiences and lessons learned. Prev Vet Med. 2018;160:105-15.

ANEXO I

Preparación y estandarización de reactivos para la ejecución del ensayo de Fijación de Complemento

Metodología para la estandarización de la suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2%

La sangre de carnero es obtenida por punción en la vena yugular con solución de Alsever. Se busca determinar una suspensión al 2% que contenga 5.4×10^8 de glóbulos rojos.

Lavado de glóbulos rojos:

1. Filtrar la sangre a través de una gasa y depositar en un tubo graduado de centrífuga de 10 ml.
2. Centrifugar la sangre a 1000 G durante 5 minutos.
3. Descartar el sobrenadante, tratando de arrastrar los leucocitos que forman una capa amarillenta en la parte superior de la columna de glóbulos rojos.
4. Suspender los glóbulos rojos en BVS, homogeneizar y centrifugar. Realizar el paso 3 veces
5. Luego de la última centrifugación descartar el sobrenadante.

Estandarización de glóbulos rojos al 2%:

Método Espectrofotométrico:

Tubo 1: para determinar el volumen de la columna de glóbulos y calcular la cantidad de solución BVS necesaria para hacer una suspensión al 2% (0.2 ml GR + 9.80 de BVS).

Tubo 2: Para determinar la lisis 100%. Realizar una dilución de los GR 2% 1/15 con agua destilada (0.2 ml de glóbulos rojos + 2.8 ml de agua destilada).

Tubo 3: blanco de lectura para el espectrofotómetro. Agregar en un tubo 5.6 ml de agua destilada y 0.4 ml de BVS que será el blanco

Una vez lisados los eritrocitos, se lee la densidad óptica(DO) a 545 nm contra el blanco

La DO esperada es de 0.450.

Solución Buffer Veronal Sódico

Preparación de la solución madre (5X)

- NaCl..... 83 g
- Na 5-5 dietil barbiturato.....10.19 g
- Ácido clorhídrico 1 N34.58 ml
- Solución concentrada de Ca^{++} y Mg^{++} 5 ml
- Agua destilada c.s.p..... 2000 ml

Preparación:

1. En un matraz aforado de 2000 ml, disolver el NaCl y el barbiturato en 500 ml de agua destilada.
2. Agregar el ácido clorhídrico.
3. Agregar 5 ml de la solución concentrada de Ca^{++} y Mg^{++} .

Preparación solución concentrada Ca^{++} y Mg^{++}

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 4,4 g
- $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 20,3 g
- Agua destilada 100 ml

1. Completar el volumen hasta 2000 ml con agua destilada y mezclar.

2. Realizar una dilución 1/5 con agua destilada la cual será la dilución de trabajo (1X) y tomar el pH que debe estar entre 7.3 y 7.4. Descartar la solución de uso (1x), después de transcurridos 5 días.

Preparación de la solución Alsever para conservación de los glóbulos rojos de oveja.

- Dextrosa 20,5 g
- Citrato de sodio 8,0 g
- Cloruro de sodio 4,2 g
- Ácido cítrico 0,55 g
- Agua destilada 1000 ml

Preparación

1. La solución se esteriliza por filtración.
2. También se puede esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, evitando que llegue a caramelizarse; en caso de que ello ocurra se debe descartar la solución.
3. La sangre se recogerá asépticamente en un recipiente que contenga un volumen de solución Alsever similar al de la sangre que se va a tomar. Se mezclan bien y se conservan en refrigerador.

Determinación de la dilución de trabajo óptima del complemento y hemolisina

Se aplica como un paso previo para la reacción de la técnica de fijación del complemento. Se busca determinar en conjunto el valor de sensibilización de la hemolisina para los hematíes de carnero expresado como UH (Unidades Hemolíticas) y la concentración de uso del

complemento en la reacción de fijación del complemento expresado como UC (unidad complemento).

Titulación del complemento y la hemolisina

La titulación simultánea del complemento y la hemolisina se debe realizar cada vez que un nuevo lote de complemento, hemolisina y/o glóbulos rojos son producidos.

Dilución del complemento

- Preparar una dilución 1:10 de complemento en BVS (100 μ l de complemento + 900 μ l de BVS) y conservar en una caja con hielo durante la titulación.
- A partir de la dilución inicial se realizan las siguientes diluciones según se muestra en la tabla 15.

Dilución de hemolisina

- Diluir la hemolisina 1:100 en BVS (10 μ l de hemolisina + 990 μ l de BVS)
- Diluir la hemolisina 1:1000 en BVS (500 μ l de hemolisina 1:100 + 4500 μ l de BVS)
- A partir de la dilución de hemolisina 1:1000 preparar en tubos las diluciones que se detallan en la tabla 16.

Tabla 15: Diluciones de complemento para su titulación.

Dilución	Complemento	BVS
1/40	100 µl	300 µl
1/50	100 µl	400 µl
1/60	100 µl	500 µl
1/70	100 µl	600 µl
1/80	100 µl	700 µl
1/100	100 µl	900 µl
1/120	50 µl	550 µl
1/140	50 µl	650 µl
1/160	50 µl	750 µl
1/240	50 µl	1150 µl
1/280	50 µl	1350 µl
1/320	50 µl	1550 µl

Tabla 16: Diluciones de hemolisina necesarias para su titulación.

Dilución	Hemolisina 1/1000	BVS
1/2000	1000 µl	1000 µl
1/4000	500 µl	1500 µl
1/6000	500 µl	2500 µl
1/8000	500 µl	3500 µl
1/10000	500 µl	4500 µl
1/12000	500 µl	5500 µl
1/14000	500 µl	6500 µl

Preparación del sistema hemolítico

- Preparar y enumerar un set de 7 tubos, uno por cada dilución de hemolisina.
- Agregar en cada tubo 1000 µl de hemolisina de cada dilución.
- Agregar 1000 µl de glóbulos rojos estandarizados al 2 % en todos los tubos que contienen las diluciones de hemolisina.
- Incubar en estufa a 37° +/- 0.5 °C durante 15 minutos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
B	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
C	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
D	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
E	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
F	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
G	1/40	1/50	1/60	1/70	1/80	1/100	1/120	1/140	1/160	1/240	1/280	1/320
H												

Figura 11: Distribución de las diluciones de complemento en microplaca de 96 pocillos para su titulación.

Ejecución de la titulación cruzada en microplaca del complemento y la hemolisina

1. Distribución de BVS:

Desde la fila A hasta la fila G de la microplaca agregar 50 μ l/pocillo de BVS 1X.

2. Distribución del complemento

Agregar 25 μ l/pocillo de cada dilución del complemento en todos los pocillos de la microplaca excepto en la fila H como se muestra en la figura 11.

3. Distribución de la hemolisina

Distribuir las diluciones de hemolisina según se indica en la figura 12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
B	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
C	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000
D	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000
E	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
F	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000
G	14000	14000	14000	14000	14000	14000	14000	14000	14000	14000	14000	14000
H	SH c/ C'	SH s/ C'	GR									

Figura 12: Distribución de las diluciones de hemolisina en la placa de 96 pocillos para su titulación.

Finalizada la incubación de las diluciones, distribuir 25 µl/pocillo del sistema hemolítico en la microplaca.

4. Distribución de los controles

- Control del sistema hemolítico con complemento (SH c/C').

50 µl de BVS

25 µl de complemento dilución 1:40

- Control del sistema hemolítico sin complemento (SH s/C').

75 µl de BVS

- Control de integridad de glóbulos rojos (GR).

75 µl de TV

Dispensar 25 µl de glóbulos rojos al 2 %

5. *Incubación*

- Cubrir y agitar la microplaca en agitador de placas durante 5´
- Incubar las microplaca a 37^o C +/- 0.5 ° C durante 30´

6. *Reposo de la placa*

- Dejar en reposo en heladera durante 30 minutos antes de su lectura.

7. *Expresión de resultados*

El resultado de la reacción en cada pocillo se evaluará por el grado de hemólisis presente en el mismo y se consignará mediante un sistema de cruces.

- ++++: fijación completa. Sobrenadante translúcido, en el fondo de la placa un botón de depósito de eritrocitos: equivalente a un 0% de hemólisis.
- +++: sobrenadante rojizo en un 25% de intensidad; en el fondo un depósito claro de eritrocitos: equivalente a un 25% de hemólisis.
- ++: sobrenadante rojizo en un 50% de intensidad; en el fondo un depósito tenue de eritrocitos: equivalente a un 50% de hemólisis.
- +: sobrenadante rojizo en un 75% de intensidad; en el fondo un depósito muy tenue de eritrocitos: equivalente a un 75% de hemólisis.

8. *Lectura de controles*

- Control del sistema hemolítico con complemento: 100 % de hemólisis
- Control del sistema hemolítico sin complemento: 0 % de hemólisis
- Control de integridad de glóbulos rojos: 0 % de hemólisis

Lectura de la titulación**Título del complemento**

Es la más alta dilución del complemento que da 100 % de hemólisis con la más alta dilución de la hemolisina. Esto es 1 unidad de complemento (UC), pero para el ensayo principal se usará 2 unidades de complemento (2UC).

Título de la hemolisina

Es la más alta dilución de hemolisina que da 100 % de hemólisis con la más alta dilución del complemento. Esto es 1 unidad de hemolisina (UH), pero para el ensayo principal se usará 2 unidades de hemolisina (2UH).

ANEXO II**Tabla de conversión para estimar el número de repeticiones en tándem en función del tamaño del producto amplificado mediante PCR**

Panel 1													
bruce06	140 (1u)	274 (2u)	408 (3u)	542 (4u)									
bruce08	312 (2u)	330 (3u)	348 (4u)	366 (5u)	384 (6u)								
bruce11	257 (2u)	320 (3u)	383 (4u)	509 (6u)	635 (8u)	698 (9u)	887 (12u)	1013 (14u)	1076 (15u)				
bruce12	302 (7u)	317 (8)	327-332 (9u)	342-347 (10u)	362 (11u)	377 (12u)	392-397 (13u)	407-411 (14u)	422 (14u)	437 (14u)	452 (14u)		
bruce42	164 (1u)	289 (2u)	414 (3u)	539 (4u)	664 (5u)	789 (6u)	914 (7u)						
bruce43	170 (1u)	182 (2u)	194 (3u)										
bruce45	133 (2u)	151 (3u)	169 (4u)	187 (5u)									
bruce55	193 (1u)	233 (2u)	273 (3u)	313 (4u)	353 (5u)	393 (6u)	433 (7u)				553 (10u)		
Panel 2A													
bruce18	130 (3u)	138 (4u)	146 (5u)	154 (6u)	162 (7u)	170 (8u)	178 (9u)	186 (10u)					
bruce21	140 (5u)	148 (6u)	156 (7u)	164 (8u)	172 - 175 (9u)								
bruce19	76 (7u)	82 (9u)	88 (11u)		163 (36u)	169 (38u)	172 (39u)	175 (40u)	178 (41u)	184 (43u)	187 (44u)	190 (45u)	193 (46u)
Panel 2B													
bruce04	144 (1u)	152 (2u)	160 (3u)	168 (4u)	176 (5u)	184 (6u)	192 (7u)	200 (8u)	208 (9u)	216 (10u)	224 (11u)	232 (12u)	240 (13u)
	256 (15u)	264 (16u)	272 (17u)	280 (18u)	288 (19u)	296 (20u)	304 (21u)	312 (22u)	320 (23u)	360 (28u)			
bruce07	134 (2u)	142 (3u)	150 (4u)	158 (5u)	166 (6u)	174 (7u)	182 (8u)	190 (9u)	198 (10u)	206 (11u)	214 (12u)	222 (13u)	230 (14u)
bruce09	124 (3u)	132 (4u)	140 (5u)	148 (6u)	156 (7u)	164 (8u)	172 (9u)	180 (10u)	188 (11u)	196 (12u)	204 (13u)	212 (14u)	220 (15u)
	236 (17u)	244 (18u)	252 (19u)	260 (20u)	268 (21u)	276 (22u)	284 (23u)	292 (24u)					
bruce16	144 (2u)	152 (3u)	160 (4u)	168 (5u)	176 (6u)	184 (7u)	192 (8u)	200 (9u)	208 (10u)	216 (11u)	224 (12u)	232 (13u)	240 (14u)
	254 (16u)	270 (18u)											
bruce30	119 (2u)	127 (3u)	135 (4u)	143 (5u)	151 (6u)	159 (7u)	167 (8)	175 (9u)	183 (10u)	191 (11u)	199 (12u)		