



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

Tesis para aspirar al título de
“Magíster de la Universidad de Buenos Aires en Salud Animal”

Título:

Nanotecnología: Diagnóstico para la brucelosis porcina

Lugar de realización:

**Coordinación de Bacteriología, Departamento de Brucelosis -
Biología Molecular - Patología, DILAB-SENASA, Talcahuano 1660,
C.P.: 1640, Martínez, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.
UNSAM Campus Miguelete, 25 de Mayo y Francia. C.P.: 1650. San
Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina**

Nombre del autor:

Vet. Rodrigo E. Balzano Parodi

Directora:

M.V.; Mg. Ana M. Nicola

Laboratorio de referencia en brucelosis – SENASA –

Co-Director:

Dr. Diego J. Comerci

Prof. de la Universidad Nacional de San Martín.

-2015-

“Los progresos de la medicina y la bioingeniería podrán considerarse verdaderos logros para la humanidad cuando todas las personas tengan acceso a sus beneficios y dejen de ser un privilegio para las minorías”

(René Gerónimo Favalaro, Buenos Aires, Congreso de Bioingeniería 1999)

Agradecimientos

Expreso mis más sinceros agradecimientos:

- a la M.V. Mg. Ana Nicola, por la confianza depositada en mi, el apoyo constante y haberme aceptado como tesista.
- al Dr. Diego Comerci, por su dedicación y optimismo permanente.
- al Dr. Andrés Ciocchini, por su paciencia y dedicación.
- al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) por el apoyo económico.
- a la Universidad Nacional de San Martín, por el aporte de recursos técnicos y humanos.
- a M.V. Hector R. Sanguinetti, por el apoyo incondicional y su dedicación, tanto laboral como personal.
- a M. Eugenia Cortina, por su buena predisposición, paciencia y enseñanza para mi formación profesional, a través de las largas horas de mesada compartida.
- al Dr. Diego Rey Serantes, por el trabajo compartido y entusiasmo.
- a Luciano Melli, por su excelente predisposición en la colaboración con este trabajo.
- al M.V. Mg. Sebastián Elena, por su colaboración profesional y su buen humor.
- a la M.V. Cristina Franco, por su colaboración profesional.
- al M.V. Mg. Carlos Zenobi, por su colaboración y aguante durante todo este proceso, tanto en lo laboral como en lo personal.
- al biólogo Mg. Fernando Raibenberg, por su apoyo profesional y humano.
- a los compañeros de SENASA en general, secretarias, paratécnicos, profesionales que de una u otra forma colaboraron para que pueda concluir este trabajo.
- a mis amigos de toda la vida, Marcelo (con quien curse esta maestría), Federico, Fabián y tantos otros que como siempre, en este y otros avatares que me han aguantado.

- a mi familia, mi vieja (una extraterrestre), sin palabras, sin ella no sería nada, a mi hijo Máximo, mi hermana Romina y mi sobrino Juan, quienes soportaron, mis ausencias y mis cambios de humor.

Un párrafo aparte para la memoria de mi padre, quien siempre seguirá vivo en mi corazón, a quien le agradezco la incondicionalidad y el amor que me dio.

-Por último, dejo constancia de que sin ninguno de los antes mencionados esto no podría haber sido posible, y que el saldo que arroja esta experiencia en mi vida fue altamente positivo para mi formación tanto profesional como humana.

Gracias totales!!!

Índice Temático	Página
1 Introducción	11
1.1 Brucelosis.....	11
1.2 Epidemiología.....	13
1.3 Patogenia.....	15
1.4 Brucelosis en cerdos.....	16
1.5 Diagnóstico.....	17
1.6 Uso de glicoproteínas recombinantes en el diagnóstico de brucelosis.....	19
2 Hipótesis.....	22
3 Objetivos.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 Materiales y métodos.....	23
4.1 Muestras biológicas.....	23
4.2 Prueba de inmunización	23
4.3 Prueba de infección	23
4.4 Aislamiento bacteriológico	24
4.5 Tipificación de las cepas aisladas	24
4.6 Western blot	26
4.7 Elisa (glico-iELSA)	26
4.8 Inmovilización del antígeno sobre micropartículas superparamagnéticas	27
4.9 Ensayo con micropartículas magnéticas y detección por fluorescencia (FMBIA)	27
4.10 Análisis de los datos	28

5 Resultados	29
5.1 PARTE I: desarrollo, optimización y validación de un ELISA indirecto utilizando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 (glico-iELISA) para el diagnostico serológico de la brucelosis porcina	29
5.1.1 Desarrollo y optimización del glico-iELISA	29
5.1.2 Prueba de infección e inmunización en cerdos	31
5.1.2.1 Prueba de infección en cerdos	31
5.1.2.2 Prueba de inmunización en cerdos	35
5.1.3 Validación del glico-iELISA	37
5.1.3.1 Análisis muestras grupo 1	37
5.1.3.2 Análisis muestras grupo 2	40
5.2 Parte II : Desarrollo , optimización y validación de un inmunoensayo de Fluorescencia utilizando como antígeno la glicoproteína AcrA- AgO9 inmovilizada sobre micropartículas magnéticas (FMBIA, fluorescent magnetic microbeads –based inmunoassay) para el diagnostico serológico de brucelosis Porcina	43
5.2.1 Optimización del inmunoensayo	43
5.2.2 Validación del ensayo	45
6 Discusión	48
6.1 Problemática del diagnostico	48
6.2 Análisis de muestras problemas.....	49
6.3 Ventajas de la utilización de AcrA-AgO9 para el diagnostico de <i>B.suis</i>	50
6.4 Perspectivas futuras	50
7 Conclusiones	52
8 Bibliografía	53

Índice de Figuras

Figura 1. Sistema de glicosilación in vivo en bacterias basado en la combinación de la vía de biosíntesis del LPS y la vía de N-glicosilación.....	20
Figura 2. Titulación de los sueros porcinos en el ensayo de glico-iELISA	30
Figura 3. Titulación del anticuerpo secundario en el ensayo de glico-iELISA	31
Figura 4. Análisis por glico-iELISA y Western blot de las muestras de suero obtenidas en la prueba de infección	32
Figura 5. Análisis por glico-iELISA de las muestras de suero obtenidas en la prueba de inmunización	36
Figura 6. Tipificación por PCR Multiplex de la sepa aisladas	38
Figura 7. Análisis por glico-iELISA de las muestras de sueros del grupo 1	38
Figura 8. Análisis por glico-iELISA de las muestras de sueros del grupo 2	40
Figura 9. Análisis ROC de los resultados obtenidos por glico-iELISA	41
Figura 10. Optimización de la cantidad de AcrA-AgO9 a inmovilizar sobre las micropartículas magnéticas	44
Figura 11. Optimización del bloqueo de las micropartículas	44
Figura 12. Optimización de los tiempos de incubación	45
Figura 13. Análisis por FMBIA	46
Figura 14. Análisis ROC de los resultados obtenidos por FMBIA	46

Índice de Tablas

Tabla 1. Órganos extraídos a los animales inoculados <i>B.suis</i>	24
Tabla 2. Primers utilizados para utilizar la PCR-Multiplex	25
Tabla 3. Análisis por BPA y FPA de las muestras por suero obtenidas en la prueba de infección	34
Tabla 4. Aislamiento bacteriológicos de <i>B.suis</i> a partir de muestras de órganos o tejidos obtenidas de los animales infectados	35
Tabla 5. Análisis por BPA, FPA y glico-iELISA de las muestras de suero obtenidas en la prueba de inmunización	36
Tabla 6. Aislamiento bacteriológico de las muestras obtenidas durante la faena de 5 cerdos con signos previos de brucelosis	37
Tabla 7. Análisis por BPA, FPA y glico-iELISA de las muestras del grupo 1	39
Tabla 8. análisis por BPA, FPA, glico-iELISA y Western blot de muestras de suero serológicamente positivas por BPA o FPA	42

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AgO: antígeno O

BPA (*buffered plate antigen*): aglutinación con antígeno buferado en placa

bp: pares de bases

BSA: albúmina sérica bovina

EDAC: 1- ethyl – 3 – (dimethyl – aminopropyl) carbodiimide hydrichloride

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*): ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FPA: ensayo de polarización fluorescente

HRP (*horseradish peroxidase*): peroxidasa de rábano

kDa: kilo Dalton

LCR: líquido cefalorraquídeo

LPS: lipopolisacárido

mA: mili amperes

mAU: mili unidad Anson (unidad de masa)

MES: 2- (N – morpholine) ethanesulfonic acid

mM: milimolar

NHS: N- hydroxy succinimide

nm: nanometro

PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*): electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: buffer fosfato salino

PBST: buffer fosfato salino con tween

PCR (*polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno

ROC (*receiver-operating characteristic*): característica operativa del receptor

SDS (*sodium dodecyl sulphate*): dodecil sulfato de sodio

TBST: buffer tris salino con tween

TSA: agar de soja trípico

Resumen

La brucelosis porcina es una zoonosis de importancia para la salud pública y la economía agropecuaria, ya que provoca importantes pérdidas en la producción y restricciones sanitarias en el comercio interno y en las exportaciones. Por ello, es importante tener un diagnóstico rápido y confiable. Hasta la fecha, la prueba confirmatoria de brucelosis es el aislamiento de la bacteria, lo cual es difícil de implementar. Los test diagnósticos vigentes se basan en pruebas serológicas que son útiles para el diagnóstico de piaras pero no permiten obtener un diagnóstico fiable de los animales a nivel individual. Por esta razón, en este trabajo se desarrolló y evaluó un nuevo test diagnóstico. El mismo consiste en un inmunoensayo (iELISA) utilizando como antígeno una glicoproteína recombinante, la cual está formada por el polisacárido O del LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9 (idéntico al polisacárido O de *B. suis*) unido covalentemente a la proteína transportadora AcrA derivada de *Campylobacter jejuni*. Este antígeno fue previamente caracterizado y validado para el diagnóstico de brucelosis en humanos y bovinos. A partir del mismo, se desarrolló y validó el glico-iELISA utilizando un panel de sueros positivos y negativos previamente caracterizados por las técnicas de aglutinación con antígeno bufferado en placa (BPA) y Ensayo de Polarización Fluorescente (FPA). Los resultados indican que el glico-iELISA permite discriminar claramente animales positivos de negativos, con un valor de *cut-off* de 0,56, resultando en una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 100%. Además, se desarrolló como prueba de concepto, un inmunoensayo de fluorescencia basado en la unión covalente del mencionado antígeno a micropartículas magnéticas con un panel reducido de sueros. Esta plataforma presenta las ventajas de reducir los tiempos de incubación y los lavados son más eficientes utilizando racks magnéticos sin necesidad de centrifugar, entre otras. Ambos ensayos desarrollados permitieron discriminar animales positivos de negativos, incluso en piaras infectadas identificando puntualmente al animal infectado y diferenciándolo de los animales negativos expuestos.

Palabras claves: brucelosis porcina, glico-iELISA, micropartículas magnéticas.

Abstract

Porcine brucellosis is an important zoonosis to public health and to agricultural economy since it causes significant losses in production, and the establishment of sanitary restrictions on local and international trade. Therefore, it is important to have a rapid and reliable diagnosis. To date, confirmatory diagnosis of brucellosis mainly relies on the isolation of the bacterium, but it is difficult to implement. Currently, most of the diagnostic tests are based on serological assays useful for diagnosing herds; however there is still not an accurate diagnosis to test individual animals. Thus, in the present work we developed and evaluated a novel indirect immunoassay (iELISA) using a recombinant glycoprotein antigen formed by the LPS O: 9-O polysaccharide of *Yersinia enterocolitica* (identical to the O polysaccharide of *B. suis*) covalently coupled to the carrier protein AcrA, derived from *Campylobacter jejuni*. This antigen was previously characterized and validated for the diagnosis of brucellosis in humans and cattle. From the above mentioned antigen we have developed and validated the glyco-iELISA using a panel of positive and negative sera previously characterized by agglutination buffered plate antigen techniques (BPA), and by fluorescent polarization assay (FPA). The results indicate that the glyco-iELISA differentiates positive animals from clearly negative ones. A cut-off value of 0.56 resulted in a diagnostic test sensitivity and specificity of 100 %, respectively.

In addition, as a proof of concept we set to develop, with a small panel of sera, an indirect fluorescence immunoassay with OAg-AcrA coupled to magnetic beads. Due to the advantage of using magnetic racks instead of centrifugation, reduced incubation time and more efficient washes, this platform has shown to be a valuable practical diagnostic tool. Both developed assays discriminate positive from negative animals, even in infected herds specifically identifying the infected animal and differentiating it from negative animals exposed.

Key Words: porcine brucellosis, glyco-iELISA, magnetic beads.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Brucelosis

El reconocimiento de la Brucelosis data del siglo XIX. Marston en 1863 es el primer médico que identifica la Fiebre de Malta como una entidad nosológica a la que denominó Fiebre Mediterránea. Bruce en 1887 fue el primero en reconocer el agente etiológico al aislar de un bazo de un soldado fallecido en la isla de Malta una bacteria que denominó "*Micrococcus melitensis*".

Las bacterias del género *Brucella* son bacilos, Gram negativos, inmóviles, no capsulados, no esporulados, de localización y multiplicación intracelular facultativa, pudiendo reproducirse tanto en el medio extracelular orgánico como principalmente en el interior de los macrófagos. Son aerobios o microaerófilos y no prosperan en condiciones estrictamente anaerobias. Algunas cepas requieren CO₂ para desarrollarse.

En la actualidad, se reconocen diez especies dentro del género *Brucella*, algunas de las cuales pueden ser subdivididas en biovariedades. Esta clasificación está basada en el hospedador de preferencia, patogenia y en características genómicas (Rajashekara G y col., 2005). Las seis especies clásicas del género y sus hospedadores de preferencia son: *B. melitensis* (caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (porcinos), *B. canis* (caninos), *B. neotomae* (ratas de desierto) y *B. ovis* (ovinos). Recientemente, se identificaron otras cuatro especies: *B. microti* (ratones de campo) (Scholz HC y col., 2008), *B. pinnipediae* (leones marinos), *B. ceti* (ballenas) (Foster G y col., 2007), y *B. inopinata* (Scholz HC y col., 2010). Esta última especie fue aislada de un implante humano infectado (cepa BO1), pero aún no está claro cuál sería su hospedador de preferencia (De BK y col., 2008). En el año 2014 fue publicado la presencia de una nueva especie de *Brucella* en mandriles (*Papio* sp), denominada como *Brucella papionis* (Whatmore A y col. 2014)

La brucelosis es una zoonosis con importancia para la salud pública y la economía agropecuaria ya que provoca en el mundo (incluyendo a la Argentina) pérdidas importantes en la producción y restricciones sanitarias en el comercio interno y en las exportaciones, tanto en la comercialización de los animales como de sus productos derivados (Sreevatsan S y col., 2000). En particular *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son las especies con mayor impacto económico del grupo (Meyer KF y Shaw EB, 1920; Huddleson, 1929). La

permanencia de esta enfermedad limita las posibilidades del sector pecuario y la comercialización internacional, influyendo negativamente en la rentabilidad de las explotaciones, en la calidad de los productos, en el consumo y en la salud humana. En la mayoría de los casos de brucelosis en humanos se puede establecer una fuerte asociación con la condición de zoonosis laboral (veterinarios, peones rurales, empleados de frigoríficos, transportistas de ganado, laboratoristas, etc.). La transmisión se produce por el contacto directo con tejidos u órganos de animales infectados (placenta, fetos), por inoculación accidental, lesiones en piel, mucosas y/o por la inhalación de partículas aerosolizadas infectadas. Si bien la brucelosis en humanos generalmente no es letal, es grave e invalidante en ausencia de tratamiento y puede conducir a la infección crónica con signos clínicos de debilidad, en forma recurrente. Los síntomas más frecuentes son la fiebre, decaimiento general, sudor y linfadenopatías, pero también puede dar lugar a la aparición de graves complicaciones como la endocarditis, meningoencefalitis, artritis, espondilitis, orquitis y trastornos psicológicos (Corbel M.J., 2006), acarreado como consecuencia, pérdidas económicas por costos médicos de prevención-tratamiento y lucro cesante.

La brucelosis es endémica en diversas áreas del mundo, aunque en gran parte del norte de Europa, Australia, parte de Estados Unidos y Canadá ha sido erradicada del ganado gracias a la implementación de programas de control. En cambio, en la cuenca del Mediterráneo, Medio Oriente, Golfo Árabe, algunas áreas de EE.UU y algunos países de Latinoamérica, incluyendo Argentina, la enfermedad persiste (Corbel MJ, 1997; Pappas G y col., 2006).

En nuestro país se ha estudiado la prevalencia de la brucelosis porcina a partir de la década de 1940. Entre 1960 y 1980 se realizaron relevamientos que indicaron una prevalencia de entre el 14,2 y 25%. En la actualidad no existen programas oficiales de monitoreo debido principalmente a la falta de un método de diagnóstico eficaz (ver introducción I.V). Sin embargo, algunos criadores realizan un monitoreo privado con el fin de controlar la enfermedad (Samartino LE, 2002). En Febrero de 2013 mediante la resolución 63/2013, el SENASA creó el "Registro Nacional de Establecimientos Oficialmente Libres de Brucelosis Porcina". La incorporación a dicho Registro es obligatoria sólo para los establecimientos que desean comercializar animales reproductores porcinos y/o material reproductivo porcino (por ejemplo, semen), pero no es obligatoria para establecimientos que crían animales para ser faenados.

1.2 Epidemiología

Entre los factores epidemiológicos de la brucelosis es importante destacar que, el nicho preferido de *Brucella* es el intracelular. Si bien los miembros de este género son relativamente resistente y puede sobrevivir por un tiempo considerable en el ambiente, aunque éste no es considerado como una fuente importante de infección. Dependiendo de las características de temperatura, pH, y humedad, *Brucella* puede sobrevivir en agua corriente a una temperatura de 25°C durante 10 días, mientras que a 0°C sobreviven dos años y medio, y en suelos húmedos, con una temperatura de 20°C y 40% de humedad relativa sobreviven hasta cinco meses. La supervivencia de la bacteria en orina es de un mes, en fetos abortados puede llegar a sobrevivir dos meses y en exudados uterinos llega a los siete meses. Sin embargo, si se expone a *Brucella* a 56°C, las bacterias pierden viabilidad rápidamente (Ray WC, 1977). Por lo tanto, la pasteurización de los productos (calentar a 62°C durante 30 minutos) elimina a todas las especies de *Brucella* que lo puedan estar contaminando. Por esta razón, es muy importante la pasteurización de productos lácteos ya que de no hacerlo, *Brucella* puede sobrevivir hasta dos meses en productos como por ejemplo quesos.

Es muy importante tener en cuenta el potencial infeccioso que tienen las bacterias pertenecientes a éste género. Se ha descrito que la dosis mínima infectiva de *Brucella* para humanos es menor si ésta ingresa por la vía respiratoria que por la ruta oral (Nusrat H, 2004). Se ha estimado que para el contagio de humanos vía aerosoles, la dosis mínima infectiva varía entre 10 y 100 bacterias (Bossi P y col., 2004). Debido al potencial epidémico, la falta de vacunas para humanos y la posibilidad de infección por aerosoles y alimentos, el género *Brucella* se clasifica como un agente de tipo B por el “Center of Disease Control and Prevention” y por el “National Institute of Allergy and Infectious Diseases” (Kaufmann AF y col., 1997; Halling SM. y col., 2005). A causa del potencial infeccioso y epidémico de *Brucella*, en 1994 en Argentina se crea dentro de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. C.G.Malbrán” (ANLIS) y en el marco del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), el servicio de brucelosis. Este servicio realiza el diagnóstico serológico, el control de calidad de reactivos, la producción de biológicos de referencia, los aislamientos, identificación y tipificación de cepas, mantiene la colección de cepas de *Brucella* y transfiere tecnología e información a las provincias con el objeto de estandarizar el diagnóstico de esta zoonosis. Además, controla la sangre a transfundir y es el Centro Nacional de Redes de Laboratorios de la ANLIS (CNRL) quien publica la información sobre donantes reactivos detectados en Bancos de Sangre oficiales y privados

de cada provincia. Los casos de brucelosis humana son notificados al INEIANLIS Dr. C.G. Malbrán en su calidad de referente de la Red Nacional de Brucelosis Humana. En el período 1994-2005 se aislaron 334 cepas de *Brucella* en humanos (en su mayoría de sangre, médula, LCR, líquido articular, líquido prostático y biopsias), de las cuales el 39% correspondió a *B. suis*, el 38% a *B. melitensis*, el 22% a *B. abortus*, y el 1% a *B. canis*. En el año 2004 se registraron 295 casos, principalmente en Buenos Aires (68), Mendoza (68), Salta (35) y Santa Fe (20) pero no hubo información de Chubut, Misiones, Neuquén, Santa Cruz, Santiago del Estero y Tierra del Fuego. En el 2005 se notificaron 284 casos, en su mayoría en Mendoza (84), Buenos Aires (57), Córdoba(44) y Salta (22) pero no hubo registros en Chubut, Entre Ríos, Jujuy, La Rioja, Misiones, Neuquén, Río Negro, San Luis, Tierra del Fuego y Tucumán (Ministerio de Salud de la Nación, Boletín Epidemiológico Periódico, edición especial N° 33). A su vez, en el I Congreso Bonaerense de Zoonosis, se presentó que el 42,3% de las cepas de *Brucella* aisladas de material biológico humano corresponde a *B. suis* por lo cual es relevante conocer, para su eventual control, la situación epidemiológica de la enfermedad en el cerdo, portador natural de esta especie (Castro H.A. y col., 2006).

Otro factor importante a tener en cuenta en la epidemiología de esta enfermedad, es que la especie *B. suis* se subdivide en cinco biovars, pero la infección en cerdos es causada por los biovars 1, 2 y 3. La enfermedad causada por los biovars 1 y 3 es similar, infectando tanto a cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) como a cerdos salvajes, mientras que la causada por el biovar 2 difiere en su rango de hospedador, su limitada distribución geográfica y su patología. Se presenta principalmente en el jabalí europeo (*Sus scrofa scrofa*) y las liebres europeas (*Lepus capensis*); sin embargo, puede transmitirse de estos reservorios a los cerdos domésticos y propagarse rápidamente en estas piaras (Thorne ET, 2001). Este biovar es raramente patógeno para los seres humanos, mientras que los biovars 1 y 3 son altamente patógenos.

La principal fuente de infección la constituyen los animales infectados ya que excretan una gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de los abortos, en la leche, y en menor medida en las secreciones genitales y orina. De este modo, los animales enfermos contaminan el suelo, los corrales, la paja de las camas, los arroyos, etc. (Castro HA y Prat MI, 2005). Particularmente, para la brucelosis porcina, los principales factores de riesgo asociados a la entrada de *Brucella* en explotaciones porcinas son la incorporación de animales infectados, el contacto con reservorios naturales y la inseminación artificial con semen de verracos infectados. Estos pueden secretar entre 10^4 a 10^5 unidades formadoras

de colonia de *B. suis* por mililitro de semen. En el semen se utilizan muchas combinaciones comerciales de antibióticos para preservarlo; sin embargo, ninguna es capaz de inactivar completamente a *B. suis*.

1.3 Patogenia

En las etapas iniciales de la infección, *Brucella* se une a las mucosas del aparato respiratorio, digestivo o reproductivo, como así también la conjuntiva, y penetra a través de ellas (Samartino LE, 2002). Luego, atraviesa el epitelio y se traslada hacia los linfonódulos locales, en donde invade neutrófilos y macrófagos. Una vez dentro de los fagocitos, las bacterias están protegidas del sistema inmune y proliferan. Cuando el número de bacterias dentro del fagocito es muy elevado, se produce la ruptura de las células eucariotas y las bacterias se liberan al torrente sanguíneo produciéndose la bacteremia, diseminándose hacia un gran número de órganos tales como hígado, bazo, médula ósea, glándulas mamarias, órganos sexuales y glándulas salivales. Esto da lugar a las distintas complicaciones de la etapa crónica de la enfermedad.

La membrana bacteriana actúa como medio de defensa y control de la interacción con el hospedador. Uno de los principales componentes de la membrana externa (ME) en bacterias Gram negativas es el lipopolisacárido (LPS), el cual se encuentra anclado en la membrana externa a través de su porción lipídica. El LPS está constituido por tres partes: el lípido A (porción del LPS asociado a la bicapa lipídica), el núcleo o *core* oligosacárido y el polisacárido O, cadena O o antígeno O (AgO). *Brucella* expresa un LPS de composición particular, la cual se refleja en una superficie con menor carga negativa global a la mayoría de los LPSs y una mayor hidrofobicidad. (Velasco J y col., 2000).

Según la presencia o ausencia de la cadena O del LPS las cepas de *Brucella* se clasifican en lisas (LPS con antígeno O) o rugosas (ausencia total o parcial del antígeno O). La mayoría de las especies (incluyendo *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) son naturalmente lisas, mientras que *B. canis* y *B. ovis* son rugosas. El LPS de las cepas lisas es el antígeno más importante de la superficie celular de *Brucella*, en particular la fracción O que es la inmunodominante (Seelke R, 2007).

1.4 Brucelosis en cerdos

La brucelosis en cerdos afecta a los órganos reproductivos, el sistema retículo-endotelial, y ocasionalmente puede afectar a otros tejidos. Al producirse la invasión del sistema circulatorio, los animales manifiestan cierta reacción térmica, pérdida parcial del apetito, pilo erección y descenso considerable de la secreción láctea (8-14 días de la primera reacción local). La fase septicémica es muy fugaz, las bacterias se sitúan en los tejidos, principalmente en las cavidades serosas e intersticiales, por ofrecer condiciones de hematosi precaria, como ocurre en vainas subcutáneas sinoviales tendinosas, articulaciones, etc. (Boffil P y col., 1989). La cronicidad de la infección se debe a que *Brucella sp.* es una bacteria intracelular facultativa capaz de sobrevivir dentro de las células del huésped después de la fagocitosis, mediante la adaptación a las condiciones intracelulares y a la evasión de las defensas del huésped (Kohler SFV y col., 2002; Baldwin GR, 2006).

La principal fuente de infección en cerdos son los animales criados para reproducción, debido a que los fetos, las envolturas y las descargas vaginales contribuyen a la diseminación de la infección, siendo las vías principales de infección la digestiva y la venérea. Los porcinos a causa de sus hábitos alimentarios y por las condiciones de su explotación tienen grandes posibilidades de infectarse por vía oral (Acha P y Szyfres B, 1986). Sin embargo, raramente se ha reportado transmisión natural durante la lactancia. Algunos lechones lactantes pueden infectarse por contacto con las marranas infectadas pero la mayoría alcanza la edad del destete sin contagiarse. Los verracos pueden transmitir la enfermedad durante la cópula y el microorganismo puede transmitirse por el semen. En múltiples ocasiones se ha comprobado que la infección se había introducido en una pira por la adquisición de un verraco infectado. También es muy probable que se infecten mediante aerosoles por vía conjuntival y por el tracto respiratorio superior.

En las cerdas, el principal síntoma de la enfermedad es el aborto en cualquier fase de gestación y el nacimiento de lechones muertos o débiles. La secreción vaginal no es evidente con frecuencia y puede parecer un caso de infertilidad más que de aborto. En los machos, la infección puede tener lugar en testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales y/o glándulas bulbo-uretrales. Las lesiones en los machos, que casi siempre son unilaterales, comienzan con una hiperplasia que puede progresar hasta la formación de abscesos; la etapa final se caracteriza por la esclerosis y la atrofia. *Brucella suis* puede estar presente en el semen, a veces sin la presencia de ningún síntoma, por lo que es muy

probable que la brucelosis sea persistente, con lesiones en el tracto genital que a menudo provocan interferencias con la actividad sexual y que pueden ser temporales o permanentes. En los jabalíes, el signo más destacado es la orquitis y pueden estar afectados los órganos sexuales secundarios; también puede excretar las bacterias en el semen sin ninguna anormalidad aparente en los órganos sexuales ni interferencia con la actividad sexual. En ambos sexos, pueden verse afectados los huesos y especialmente las articulaciones y las vainas de los tendones, lo que causa cojera y a veces, parálisis. Una proporción significativa de los cerdos se recuperará de la infección, con frecuencia en unos 6 meses, pero muchos permanecerán infectados de forma permanente, y se convertirán en portadores; es raro que se exprese en forma clínica. En las piaras grandes el proceso infeccioso es persistente y se transmite de una generación a otra (Rhaway N., 1993). La infección en los órganos genitales es menos duradera en la hembra que en el macho y en éste puede persistir toda la vida.

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico del laboratorio tiene una gran importancia para la detección precoz de los animales enfermos, ya que es fundamental para mantener una profilaxis sistemática, que tenga como finalidad la erradicación final de la enfermedad en el país. De hecho, la situación epidemiológica de la brucelosis en cerdos en Argentina es desconocida (Samartino LE, 2002).

Actualmente, en Argentina como en muchos otros países es que las pruebas de aglutinación, que son las más populares para el diagnóstico de brucelosis, suelen dar falsos negativos, porque la brucelosis porcina no suele dar altos títulos de aglutininas anti-*brucella* fuera del corto periodo de infección aguda. Por eso en estos países la brucelosis porcina esta subdiagnosticada, y por lo tanto es necesario contar con test que permitan diagnósticos de alta performance, por ende que logren diferenciar claramente entre animales positivos y negativos. En los programas de erradicación de brucelosis interesa mucho que la prueba empleada sea lo suficientemente sensible para que el grado de error por “falsos negativos” sea el menor posible, ya que el objetivo es eliminar todo foco de infección de una piara. En particular para porcinos, las pruebas serológicas no permiten obtener un buen diagnóstico, aún combinando sus resultados, determinando que ninguna de las pruebas serológicas convencionales sean totalmente confiables. El único método confiable es el aislamiento de la bacteria a partir del tejido, lo cual es muy difícil de implementar, ya que se tardan varios días en obtener los resultados e involucra la amplificación de la bacteria, lo que implica un riesgo de contaminación y además requiere de personal altamente calificado e instalaciones

adecuadas, por todo esto es que se hace inviable como método de diagnóstico de rutina. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico de uso habitual son los serológicos. Aunque hasta la fecha, según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), ninguna de las pruebas serológicas tradicionales ha resultado ser completamente fiable en el diagnóstico rutinario individual en los cerdos, se las utiliza únicamente para identificar las piaras infectadas. Dentro de estas pruebas, las más ampliamente utilizadas se basan en las aglutinaciones con suspensiones de bacterias enteras como la fijación del complemento y el BPA, en el cual se emplea un cultivo inactivado de *Brucella abortus*, cepa 1119-3, con una concentración celular final del 11% y con un pH de 3.8., que se enfrenta sobre una placa al suero problema, y luego se coloca en el aglutinoscopio donde se realiza la lectura, observándose, si se forman grumos o no. En ambos casos se detectan anticuerpos contra los componentes de la membrana externa, de los cuales el LPS es el más abundante. Las pruebas de ELISA también utilizan LPS y no eliminan el problema de la reactividad cruzada. Con respecto a este tipo de plataformas diagnósticas algunos autores describen un ELISA para brucelosis porcina que emplea como antígeno el core del LPS, que disminuye las reacciones cruzadas debidas a *Y. enterocolitica* (Castro HA y col., 2006). A diferencia del diagnóstico en bovinos, la reacción de fijación de complemento no es adecuada para el porcino, ya que el complemento de cerdo interactúa con el complemento de cobayo y disminuye la sensibilidad de la determinación. Otra técnica diagnóstica es el ensayo de polarización de fluorescencia (FPA) que utiliza como antígeno un fragmento de bajo peso molecular (22 kDa) del polisacárido O del LPS de la cepa 1119-3 de *B. abortus* marcado con isotiocianato de fluoresceína, el mecanismo se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor principal que influencia la velocidad de rotación, en este caso la molécula pequeña es el antígeno marcado con isotiocianato de fluoresceína que emitirá una reacción que puede medirse por la luz polarizada plana a una determinada longitud de onda. Sin embargo, si esta molécula se une a los anticuerpos en solución, aumentará su tamaño y la velocidad de rotación de las mismas descenderá, provocando una medida menor. Hasta el momento, la prueba de FPA es de utilidad para el diagnóstico de la brucelosis porcina (Nielsen K y col., 1999), pero se desconocen los niveles de sensibilidad y especificidad del ensayo. Conforme a lo expresado en el manual de animales terrestres de la OIE, las pruebas de ELISA y FPA, son utilizadas sólo con fines de comercialización internacional (OIE, Capítulo 2.8.5, 2009).

Debido a la problemática planteada y con el surgimiento de las técnicas de ADN recombinante surgen los diagnósticos basados en la utilización de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, y en el caso específico de *Brucella suis*, se está trabajando en el

empleo de antígenos distintos al LPS los cuales proporcionan una mayor especificidad (evitando fenómenos de reacción cruzada) y una mejor estandarización de los reactivos.

1.6 Uso de glicoproteínas recombinantes para el diagnóstico de brucelosis

En este trabajo, se utilizó como antígeno una glicoproteína recombinante producida en bacterias, y previamente caracterizada y validada para el diagnóstico de brucelosis en humanos y bovinos (Iwashkiw J y col., 2012; Ciocchini AE y col., 2013). Esta glicoproteína consiste en la fracción del polisacárido O del LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9 covalentemente unida a la proteína transportadora AcrA derivada de *Campylobacter jejuni* (desde ahora AcrA-AgO9) (Iwashkiw y col., 2012). El polisacárido O del LPS de *B. abortus* contiene los dos epitopes, el A (homopolímero de N-formilperosamina unidos por enlaces α -1,2) y el M (pentasacárido con cuatro enlaces α -1,2 y uno α -1,3 del polímero del mismo azúcar). El polisacárido O de *Y. enterocolitica* está compuesto únicamente por unidades de N-formilperosamina unidos por enlaces α -1,2. *B. abortus* tiene aproximadamente un 98% de epitopes A, *B. suis* tiene una relación de 1:7 de enlaces α 1,3- α 1,2, mientras que *B. melitensis* tiene únicamente el epitope M de unidades repetitivas del pentasacárido (Bundle DR y Perry, 1985; Caroff M y col., 1984; Meikle PJ y col., 1989). Estas similitudes estructurales en el polisacárido O podrían explicar porque en trabajos previos el antígeno AcrA-AgO9 fue reactivo a muestras de suero obtenidas de pacientes humanos con brucelosis confirmada por aislamiento bacteriológico de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* (Ciocchini AE y col., 2013). Este antecedente estaría indicando la posible utilidad de este antígeno para el diagnóstico de brucelosis en cerdos, a pesar de que existan mínimas diferencias estructurales del polisacárido O. La glicoproteína AcrA-AgO9 fue producida y purificada utilizando un sistema de glicosilación *in vivo* en bacterias basado en la combinación de las vías de biosíntesis del LPS y la vía de N-glicosilación de *Campylobacter jejuni* (**Figura 1**). En este sistema, varias glicosiltransferasas agregan secuencialmente al transportador de lípidos undecaprenil pirofosfato los azúcares necesarios para la síntesis del heptasacárido en el lado citoplasmático de la membrana interna. El oligosacárido unido al lípido es transportado hacia el periplasma y luego transferido a la proteína AcrA por la oligosacariltransferasa (OTasa) PglB de *Campylobacter jejuni*. Debido a la especificidad relajada de PglB, la co-expresión de AcrA y PglB de *C. jejuni* en *Yersinia enterocolitica* O:9 resulta en la glicosilación de AcrA con el AgO9 del hospedador, el cual también es ensamblado sobre el carrier lipídico undecaprenil pirofosfato por una delicada maquinaria biosintética que consiste de un set de enzimas que modifican azúcares, glicosiltransferasas y transportadores de membrana. Esta maquinaria es compartida por *Yersinia enterocolitica* y

Brucella abortus. Los análisis de espectrometría de masas demostraron la transferencia a AcrA de un homopolímero de *N*-formilperosamina estructuralmente idéntico al polisacárido O de *Yersinia enterocolitica* O:9 y *Brucella abortus* (Iwashkiw y col., 2012). De esa manera, co-expresando en *Yersinia enterocolitica* O:9 las proteínas PglB y AcrA de *Campylobacter jejuni*, se pudo sintetizar la glicoproteína AcrA-AgO9 utilizada como antígeno en este trabajo.

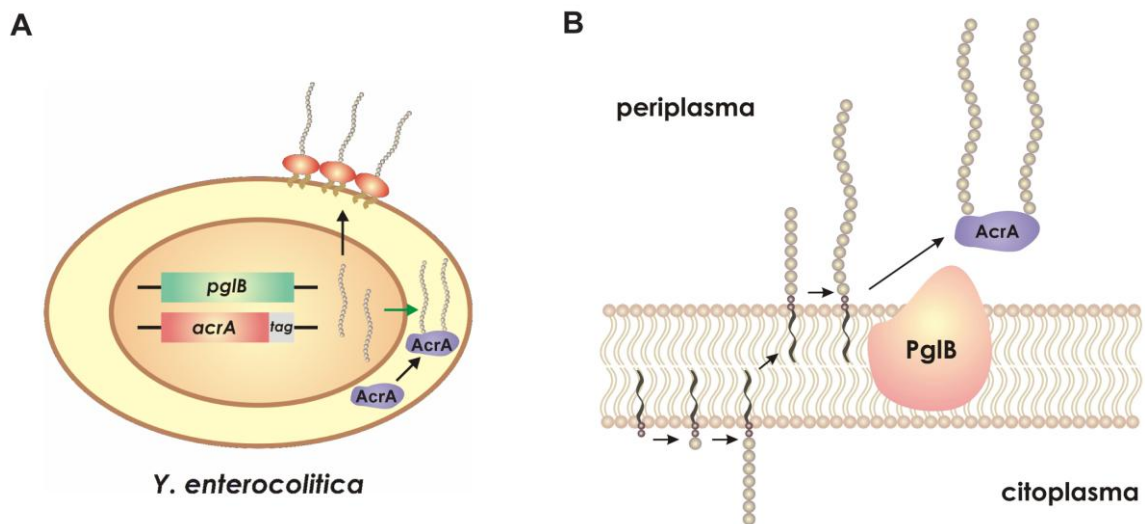


Figura 1. Sistema de glicosilación *in vivo* en bacterias basado en la combinación de las vías de biosíntesis del LPS y la vía de *N*-glicosilación. A) La co-expresión de AcrA y PglB de *C. jejuni* en *Yersinia enterocolitica* O:9 resulta en la glicosilación de AcrA con el AgO9 del hospedador, el cual también es ensamblado sobre el carrier lipídico undecaprenil pirofosfato por un conjunto de enzimas que modifican azúcares, glicosiltransferasas y transportadores de membrana. Esta maquinaria biosintética es compartida por *Yersinia enterocolitica* y *Brucella abortus*. B) En este sistema, varias glicosiltransferasas agregan secuencialmente al transportador de lípidos undecaprenil pirofosfato los azúcares necesarios para la síntesis del heptasacárido en el lado citoplasmático de la membrana interna. El oligosacárido unido al lípido es transportado hacia el periplasma y luego transferido a la proteína AcrA por la oligosacariltransferasa (OTasa) PglB de *Campylobacter jejuni*.

La utilización de glicoproteínas recombinantes presenta varias ventajas. En primer lugar, el antígeno AcrA-AgO9 fue producido en *Y. enterocolitica* O:9, que es un microorganismo de grupo de riesgo 2, fácil de manipular y cultivar, sin la necesidad de cultivar *Brucella*, resultando en la reducción de costos y en un proceso de producción más seguro. Esto último, resulta relevante considerando que la brucelosis constituye una de las infecciones más comunes de adquirir en las plantas de producción de vacunas y antígenos, y en laboratorios de diagnóstico clínico e investigación. La fermentación de *Y. enterocolitica* permite producir grandes cantidades de antígeno de fácil purificación. Además, la tecnología de glicoingeniería implementada en este trabajo para producir al antígeno elimina la necesidad de purificar el LPS y de tratamientos químicos para el aislamiento de la cadena O del LPS. Finalmente, tampoco se necesita de “crosslinking” químico para unir a los carbohidratos con las proteínas necesarias para la producción de glicoconjugados con un

patrón de azúcares definidos y reproducibles ya que el proceso de glicosilación y la longitud del polisacárido O son controlados *in vivo*. Además, el sistema permite producir lotes de antígenos homogéneos y estandarizados, y esto es muy importante, con vistas al futuro ya que hasta el momento no hay un antígeno de referencia estandarizado, y es bien sabido que la fuente de antígeno puede influir significativamente en los resultados de una prueba.

En este trabajo, hemos desarrollado y validado un nuevo inmunoensayo para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina utilizando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 inmovilizada sobre dos plataformas diferentes, sobre placas de ELISA y sobre micropartículas superparamagnéticas. Para la validación, se utilizaron muestras de suero obtenidas de cerdos provenientes de distintos establecimientos como así también muestras obtenidas de pruebas experimentales de inmunización e infección realizadas en nuestro laboratorio. A partir de esta última prueba, se logró aislar la bacteria y reconocer los principales órganos que se ven afectados durante la infección.

2. HIPÓTESIS

Considerando que el antígeno recombinante AcrA-AgO9, desarrollado en el laboratorio, fue previamente validado para el diagnóstico de brucelosis humana y bovina, y las similitudes estructurales del polisacárido O del LPS de *Brucella abortus* y *Brucella suis*, es que proponemos en este trabajo que este mismo antígeno podría utilizarse para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

El objetivo general del proyecto es el desarrollo y la validación de un nuevo método para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina utilizando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 inmovilizada sobre diferentes plataformas de diagnóstico.

3.2 Objetivos Específicos

- Obtención de muestras de suero de animales serológicamente positivos y negativos, y confirmación de la infección por aislamiento bacteriológico.
- Estudiar los órganos en los cuales se aloja *Brucella suis* durante la infección.
- Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnóstico de brucelosis porcina empleando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9. Optimización y validación del método.
- Desarrollo de un inmunoensayo basado en la utilización de micropartículas magnéticas y detección por fluorescencia para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina. Optimización y validación del método.

4. Materiales y Métodos

4.1 Muestras biológicas

En este trabajo se analizaron cuatro grupos de sueros previamente caracterizados por las técnicas serológicas de BPA y FPA, por el Departamento de Brucelosis de la Dirección de Laboratorio Animal de SENASA. Estos cuatro grupos se componen de: un grupo de 180 sueros negativos provenientes de un país libre de brucelosis (Canadá), otro grupo de 32 sueros negativos provenientes de campos argentinos sin historial de brucelosis, 76 sueros negativos provenientes de campos argentinos con casos de brucelosis porcina y 130 sueros positivos para ambas técnicas. Además se analizaron 6 sueros positivos por BPA, pero FPA negativos, y 3 sueros negativos para BPA y FPA positivo.

En un establecimiento se detectaron 5 animales positivos, de los cuales al momento del sacrificio se realizó extracción de sangre y ganglios maxilares y mamarios o inguinales para su posterior aislamiento bacteriológico y tipificación.

4.2 Prueba de inmunización

A 12 cerdos de aproximadamente 6 meses de edad, se les inoculó por vía intramuscular una dosis de 10^9 bacterias de *Brucella suis* cepa 1330, inactivadas a 60°C durante una hora. A los 30 días de iniciada la experiencia los animales fueron sacrificados. Previo a su inoculación y al finalizar la experiencia, a los animales se les le realizó la extracción de sangre y se obtuvieron los correspondientes sueros.

4.3 Prueba de infección

Seis cerdos de aproximadamente 4 meses de edad, se inocularon con 5×10^6 UFC de la cepa *B. suis* 1330, por vía intermuscular y a 2 animales se los dejó como testigos (sin inocular). Previo a su inoculación se extrajo sangre de todos los animales. A los 16 días se realizó una sangría exploratriz y dos cerdos murieron (animales 2 y 8), razón por la cual se decidió inocular a los cerdos testigos con la misma dosis que a los cerdos iniciales. A los 60 días de iniciada la experiencia, los 6 cerdos fueron sacrificados y se extrajeron muestras de suero, sangre entera y de diversos órganos y tejidos que se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Órganos extraídos a los animales inoculados con *B. suis*.

N° Animal	Órganos - Linfonódulos
1	Bazo, hígado, ganglio gastro-esplénico, inguinal superficial, submaxilar, pre-pectoral
3	Bazo, hígado, ganglio gastro-esplénico, inguinal superficial, submaxilar, pre-pectoral, Timo
4	Bazo, hígado, ganglio gastro-esplénico, inguinal superficial, submaxilar, pre-pectoral.
5	Bazo, hígado, ganglio inguinal superficial y submaxilar.
6	Bazo, hígado, ganglio gastro-esplénico, inguinal superficial, submaxilar y timo
7	Bazo, hígado, ganglio gastro-esplénico, inguinal superficial, submaxilar, pre-pectoral, timo y tonsila.

4.4 Aislamiento bacteriológico

Las muestras (órganos y ganglios disgregados o sangre entera) se sembraron en medio bifásico de Ruiz Castañeda y en TSA (Agar Triptona de Soja) adicionado con los antibióticos vancomicina (Sigma-Aldrich) 20 mg/L, cicloheximida (ICN Biomedicals) 100 mg/L, bacitracina 10 U/ml (Sigma-Aldrich), nalidixico 5 mg/ml (Sigma-Aldrich), polimixina B 6000 U/ml (Sigma-Aldrich) y amphotericina B 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 4°C durante una semana y se hicieron observaciones diarias para ver la presencia de desarrollo bacteriano.

4.5 Tipificación de las cepas aisladas

Para aislar el ADN genómico de las distintas cepas (*B. abortus* 2308, *B. suis* 1330, *B. mellitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, RV51) y muestras a tipificar, se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se cosecharon las bacterias y se resuspendieron en 200 µl de PBS (Buffer Fosfato Salino 0,01 M, pH 7,4). Luego, se agregaron 20 µl de proteinasa K (600 mAU/ml) y 200 µl de Buffer de lisis AL y se incubó por 10 minutos a 56°C. Luego, se agregaron 200 µl de Etanol 96%, se homogenizó y

se pasó la muestra por la columna “DNeasy Mini spin column”, se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm para permitir que el ADN se una a la columna. Luego, se realizaron dos lavados de 500 µl, primero con el Buffer AW1 centrifugando 1 minuto a 8000 rpm y luego con el Buffer AW2 centrifugando 3 minutos a 14000 rpm. Finalmente se eluyó el ADN con 200 µl de Buffer AE, incubando durante 1 minuto y centrifugando otro minuto a 8000 rpm.

Una vez obtenido el ADN genómico se procedió a realizar la PCR-Multiplex. Para ello, se emplearon los primers que se detallan en la **Tabla 2**. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µl conteniendo 200 ng de templado, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,4 mM (cada uno), primers 0,5 µM (cada uno) y Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies) 1,5 U en Buffer Taq provisto por el fabricante.

Tabla 2. Primers utilizados para realizar la PCR-Multiplex.

Primer	Secuencia (5' – 3')	Amplicon (bp)
BMEI0998f	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG	1682
BMEI0997r	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	
BMEII843f	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	1071
BMEII844r	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	
BMEI1436f	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT	794
BMEI1435r	TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC	
BMEII0428f	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	587
BMEII0428r	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	
BR0953f	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	272
BR0953r	GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	
BMEI0752f	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	218
BMEI0752r	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	

El termociclador se programó de la siguiente manera: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 7 minutos, 35 ciclos de 35 segundos a 95°C para la desnaturalización del templado, 45 segundos a 64°C para el annealing de primers, 3 minutos a 72 °C para la extensión y un ciclo final para la elongación de los transcritos de 6 minutos a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio y utilizando un marcador de peso molecular O´Range Ruler

100bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc) y visualizados en el transluminador Foto/Analyst® Investigator Eclipse (Fotodyne Inc).

4.6 Western blot

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%. Se sembraron 0,5 µg de la proteína AcrA no glicosilada y 0,2 µg de AcrA-AgO9 glicosilada por calle. Las muestras fueron previamente incubadas a 100°C durante 5 minutos con Buffer de craqueo (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; DTT 100 mM; SDS 2%; azul de Bromofenol 0,1% y Glicerol 10%). La electroforesis se llevó a cabo a Voltaje constante. Luego, las proteínas se transfirieron (transferencia semiseca) a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (Hybond-ECL, Amersham Biosciences), durante 1 hora a amperaje constante (mA = superficie de la/s membrana/s x 0,8). Las membranas se incubaron con solución de bloqueo [leche de cabra al 5% en TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,5; Tween-20 0,1%)] durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Luego, se incubaron con las muestras de suero (dilución 1/1.000 en solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG porcina conjugado a HRP (Abcam®) en una dilución 1/10.000 en solución de bloqueo. Luego de cuatro lavados con TBST, se reveló por quimioluminiscencia (Supersignal West Pico chemiluminiscent substrate detection reagents, Pierce Chemical Co), según las indicaciones del fabricante.

4.7 ELISA (glico-iELISA)

Placas de poliestireno “high binding”, fondo plano de 96 pocillos (Costar Corning Incorporated) se sensibilizaron con 50 µl de una solución 2,5 µg/ml de la glicoproteína recombinante (AcrA-AgO9) en Buffer Carbonato-Bicarbonato 0,05 M pH 9,6, durante 18 horas a 4°C. Luego, se realizaron 4 lavados con solución de lavado PBST, (PBS con Tween-20 0,2%), y se incubó durante una hora a 37°C con solución de bloqueo (5% de leche descremada bovina en PBST). Para determinar las diluciones óptimas de trabajo se realizó la titulación de los sueros porcinos y del anticuerpo secundario (anti-IgG de porcino conjugada a HRP, Abcam®). Para ello, se utilizó un suero positivo fuerte, medio y bajo y tres sueros negativos elegidos en base a sus valores de BPA, FPA y Western blot. Finalmente, se decidió incubar por duplicado con los sueros porcinos diluidos 1/200 en solución de

bloqueo y a 37°C. Luego de 4 lavados los anticuerpos unidos al antígeno fueron detectados con el anticuerpo secundario diluido 1/5.000, en solución de bloqueo, incubados durante 1 hora a 37°C. Luego de los lavados, la actividad de la peroxidasa se evidenció con el agregado del sustrato [H_2O_2 0,36%; 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 0,01% en Buffer Citrato pH 5]. Luego de 3 minutos, la reacción se frenó con H_2SO_4 0,16 M y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas (FilterMax Technologies).

4.8 Inmovilización del antígeno sobre micropartículas superparamagnéticas

La activación de las micropartículas magnéticas modificadas con grupos carboxilo (COMPEL Magnetic, COOH modified, Bangs Laboratories) se realizó en un solo paso utilizando EDAC [1-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida hydrochloride] y NHS [N-hidroxi succinimida] como activador de la reacción. La unión del antígeno sobre las partículas se produce mediante una unión covalente entre los grupos carboxilo de las partículas magnéticas y los grupos amino primarios libres de la proteína. Para activar una cantidad suficiente de partículas magnéticas para 50 reacciones, se tomaron 250 μl de la suspensión de partículas (1,1-1,2 g/ml), se realizaron 2 lavados con buffer MES (2-[N-morfolino ácido etanosulfónico) 100mM pH 5,5] y se incubaron con una solución de EDAC 17 mg/ml, NHS 1mM en buffer MES pH 5,5 durante 30 minutos en agitación orbital a temperatura ambiente. Luego de la activación, se realizaron 2 lavados con PBS y se incubó con distintas concentraciones de la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 (2, 1, 0,5 y 0,25 μg /reacción) en 0,5 ml de PBS durante 3 horas en agitación orbital a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con distintas soluciones de bloqueo [gelatina de pescado 1% o seroalbúmina bovina (BSA) 1%, glicina 35 mM], y se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación orbital. Luego de tres lavados con el buffer de conservación (gelatina de pescado o BSA 1%, Tween-20 2,25%, azida sódica 0,01%), las micropartículas se resuspendieron en 1ml de la misma solución y se conservaron a 4°C hasta su uso. Todos los lavados se realizaron en *racks* magnéticos. Finalmente, se decidió pegar 2 μg de antígeno por reacción, y bloquear y conservar las micropartículas con BSA.

4.9 Ensayo con micropartículas magnéticas y detección por fluorescencia (FMBIA).

Para realizar el ensayo se pusieron a punto varias condiciones entre ellas, la dilución de los sueros (probándose las diluciones 1/100, 1/200) y los tiempos de incubación (5, 15, 30 y 60

minutos). Finalmente, para realizar los ensayos se lavaron 20 μ l de micropartículas sensibilizadas con el antígeno por reacción con solución de lavado (PBST-0,2%). Luego, se resuspendieron las micropartículas en buffer de lavado y se dispensaron 100 μ l por tubo. Se incubaron con 200 μ l de los sueros porcinos diluidos 1/200 en solución de lavado durante 15 minutos con agitación orbital a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con solución de lavado. Se agregó 200 μ l del anticuerpo secundario anti-IgG de porcino conjugado con el fluoróforo DyLight 650 diluido 1/1.000 en buffer de lavado y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital. Por último, luego de los lavados, las partículas magnéticas se resuspendieron en 300 μ l de PBS y se colocaron en una placa negra de 96 pocillos (Greiner bio-one). La medición se realizó en un fluorómetro de placas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter).

4.10 Análisis de los datos

Para el ensayo de ELISA los resultados se expresaron como la relación entre el promedio de las absorbancias medidas a 450 nanómetros (Ab) del suero incógnita y el suero control positivo. La relación de reactividad se calculó como sigue: Reactividad relativa = Promedio Ab muestra / Promedio de Ab control positivo. Los resultados del ensayo con micropartículas y detección por fluorescencia se expresaron como la relación entre la fluorescencia promedio del suero en estudio respecto al suero control positivo. En cada ensayo se incluyó además un suero control negativo. Reactividad relativa = UF media de la muestra / UF media del control positivo. El análisis estadístico por curvas ROC (*receiver-operating characteristic*) se realizó utilizando el *software* GraphPad Prism [versión 5.01 para Windows, San Diego California EE.UU., (<http://www.graphpad.com>)]. Este deriva de un análisis gráfico que permite evaluar la *performance* de un determinado ensayo en términos de sensibilidad y especificidad para cada posible valor de *cut-off* del ensayo. Para realizar este análisis se deben considerar punto a punto las dos afirmaciones correctas, verdadero positivo (VP) y verdadero negativo (VN), y los dos posibles errores a cometer, falso positivo (FP) y falso negativo (FN), que dependen del *cut-off* seleccionado. Las variaciones en número de estos parámetros dan lugar a diferentes valores de sensibilidad y especificidad. Con los valores relativizados de todos los sueros analizados se confeccionaron curvas ROC donde se indica también el área bajo la curva.

5. Resultados

5.1. PARTE I: Desarrollo, optimización y validación de un ELISA indirecto utilizando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 (glico-iELISA) para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina.

5.1.1 Desarrollo y optimización del glico-iELISA

Utilizando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9, se desarrolló un ELISA indirecto basado en la detección de anticuerpos IgG anti-polisacárido O en muestras de sueros porcinos. La detección de los anticuerpos unidos al antígeno se realizó empleando anticuerpos anti-IgG de cerdo conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). El antígeno AcrA-AgO9 consiste en una proteína *carrier* o aceptora (AcrA) acoplada covalentemente al polisacárido O del LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9, el cual es estructuralmente idéntico al polisacárido O de *B. abortus*.

Con el objetivo de determinar la utilidad del antígeno AcrA-AgO9 para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina y optimizar las condiciones del ensayo, primero se realizó una titulación de 3 sueros positivos, provenientes de un campo en Argentina, con antecedentes de brucelosis porcina los cuales se clasificaron como fuerte, medio y débil según los valores de FPA, y 3 sueros negativos según las pruebas de BPA y FPA, de los cuales los sueros 1 y 2 provienen de un campo en Argentina libre de brucelosis, y el suero 3 del campo que han sido seleccionados los sueros positivos. Como el antígeno AcrA-AgO9 ya fue validado para el diagnóstico de brucelosis bovina y humana, para sensibilizar las placas de ELISA se utilizó la misma cantidad de antígeno que en los ensayos anteriores (125 ng/pocillo) (Ciocchini AE. Y col.; 2014). Se realizaron diluciones seriadas al medio de los sueros y la dilución del conjugado se mantuvo constante (1/5.000).

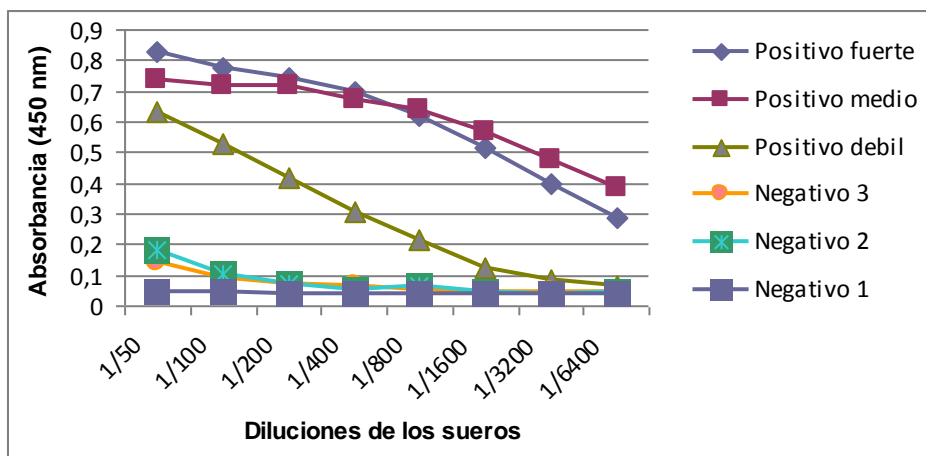


Figura 2. Titulación de los sueros porcinos en el ensayo de glico-iELISA. En el ensayo Se realizaron diluciones seriadas al medio de tres sueros positivos (fuerte, medio y débil) y tres negativos y se mantuvieron constantes la cantidad de antígeno (125 ng/pocillo) y la dilución del anticuerpo secundario (anticuerpos anti-IgG de cerdo conjugados a HRP, 1/5.000).

Los resultados obtenidos demuestran que utilizando este antígeno es posible discriminar claramente entre animales positivos, incluso positivos débiles, de negativos en un amplio rango de diluciones. Además, la mejor relación de señal entre el suero positivo débil y el negativo más alto (suero negativo 1) se obtuvo con la dilución del suero 1/200 (**Figura 2**).

A continuación se determinó la dilución óptima del anticuerpo secundario. Para ello, se realizaron diluciones seriadas al medio del anticuerpo secundario manteniendo constantes la cantidad de antígeno inmovilizado a la placa y la dilución de los sueros, determinada en el paso previo (1:200). Como se muestra en la **Figura 3**, la mejor relación de señal entre el suero positivo débil y el negativo más alto (suero negativo 1) se obtuvo con la dilución 1/5.000 del anticuerpo secundario.

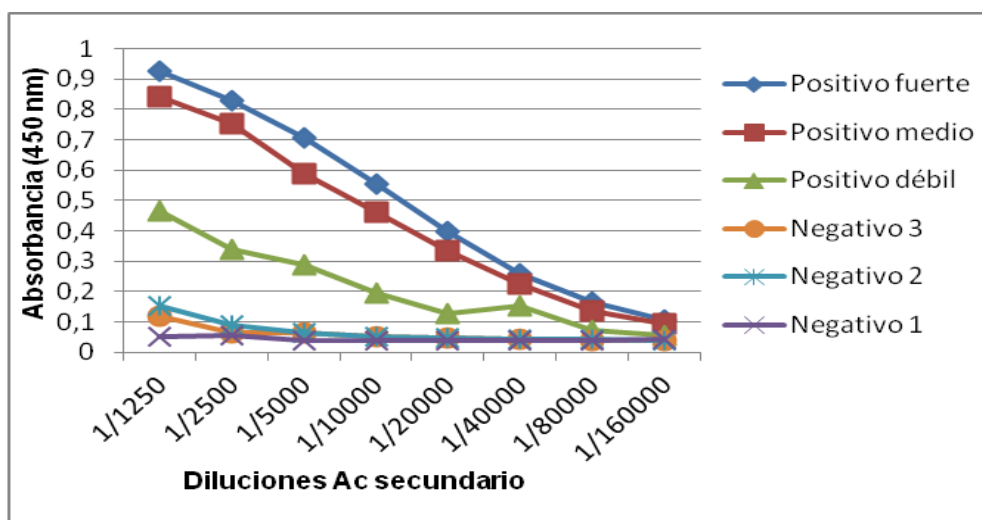


Figura 3. Titulación del anticuerpo secundario en el ensayo de glico-iELISA. En el ensayo se realizaron diluciones seriadas al medio del anticuerpo conjugado (anticuerpos anti-IgG de cerdo conjugados a HRP) a partir de la dilución 1/1250, y se mantuvieron constantes la cantidad de antígeno (125 ng/pocillo) y la dilución de los sueros porcinos (1/200). Se analizaron tres sueros positivos (fuerte, medio y débil) y tres negativos.

En base a los ensayos de optimización se determinaron las siguientes condiciones para el ensayo glico-iELISA: a) sensibilización de la placa: 125 ng de la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 por pocillo; b) dilución de la muestra (sueros porcinos): 1/200; c) dilución del anticuerpo secundario: 1/5.000. Además, en todos los ensayos se utilizarán los sueros positivo débil y negativo 1 como controles positivo y negativo, respectivamente. En adelante, todos los sueros analizados se relativizarán al suero positivo débil (Reactividad relativa).

5.1.2 Pruebas de infección e inmunización en cerdos

Como prueba de concepto y para evaluar la utilidad diagnóstica del glico-iELISA para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina, se realizaron pruebas de infección e inmunización en cerdos.

5.1.2.1 Prueba de infección en cerdos

En este ensayo se inocularon seis cerdos con 5×10^6 UFC de la cepa *B. suis* 1330 (cepa virulenta de referencia, biotipo 1) por vía intramuscular. Otros dos animales (animales 1 y 5) se incluyeron como testigos para evaluar una posible transmisión de la infección entre los animales convivientes. Para evaluar la progresión de la infección y la respuesta serológica se tomaron muestras de suero previo a la infección y a los 16 y 60 días post-infección; asimismo, a los 60 días post-infección se tomaron muestras de distintos órganos y tejidos para aislamiento bacteriológico.

Para evaluar la respuesta serológica, las muestras de suero obtenidas a los 0, 16 y 60 días post-infección se analizaron en paralelo con las pruebas de BPA y FPA, actualmente utilizadas por el Laboratorio de Brucelosis del SENASA, y con el glico-iELISA.

En la **Figura 4A**, se muestran los resultados obtenidos por glico-iELISA. Al día 16 post-inoculación se observa que los animales inoculados con la cepa de *B. suis* incrementan los niveles de anticuerpos contra el antígeno AcrA-AgO9 respecto al día 0 de la experiencia (pre-infección). En el caso de los animales testigos, se observa que el animal 1 no presentó respuesta de anticuerpos. En cambio, el animal 5 incrementó sus niveles de anticuerpos IgG anti AcrA-AgO9. Este resultado indica que el animal testigo se infectó naturalmente por la convivencia con animales infectados. Durante la toma de muestras al día 16 post-infección fallecieron dos animales (animales 2 y 8), por lo que se decidió inocular a los dos animales que se habían dejado como testigos. Además, a este tiempo post-infección se tomaron muestra de sangre entera para aislamiento bacteriológico, de las cuales se obtuvo aislamiento de la bacteria en los animales 3 y 6.

Al día 60 post-infección, como se puede observar en la **Figura 4A**, todos los animales elevaron significativamente sus niveles de anticuerpos anti AcrA-AgO9, incluso los animales 1 y 5 que fueron inoculados tardíamente, aunque en estos casos, la respuesta fue levemente menor.

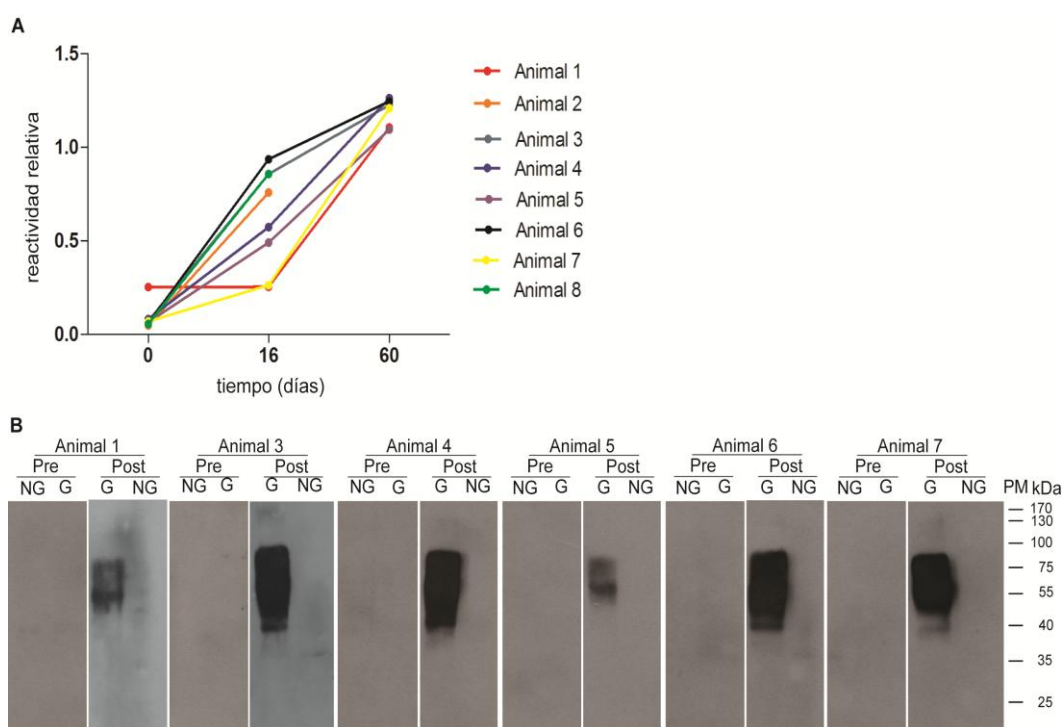


Figura 4. Análisis por glico-iELISA y Western blot de las muestras de suero obtenidas en la prueba de infección. Al día 0, en un lote de 8 cerdos, se inocularon 6 animales con una dosis de 5×10^6 UFC de *Brucella suis* 1330, dejando 2 animales como testigos. Al día 16 se realizó una extracción de sangre a los 8 animales durante la cual murieron 2 animales (animales 2 y 8); por lo tanto, se decidió inocular a los testigos (animales 1 y 5). Al día 60, se realizó el sacrificio de los seis animales y se extrajeron muestras de sangre para serología y aislamiento, y órganos para aislamiento bacteriológico. A) Glico-iELISA. Reactividad relativa (datos relativizados al control positivo). B) Análisis por Western blot de las muestras de suero obtenidas previo a la inoculación (Pre) y a los 60 días post-infección (Post) frente a la proteína AcrA no glicosilada (NG) y AcrA-AgO9 (G, proteína AcrA glicosilada).

Para confirmar la especificidad de la reacción, los mismos sueros obtenidos a los días 0 y 60 post-infección fueron analizados por *Western blot* contra las formas glicosiladas y no glicosiladas de AcrA (**Figura 4B**). La reactividad contra el AgO9 se observó sólo con los sueros post-inoculación y ninguno de los sueros fue reactivo contra la forma no glicosilada de AcrA. Estos resultados indican que la respuesta de anticuerpos detectada se dirige específicamente contra AgO9 y no hacia la proteína aceptora AcrA. Asimismo se observa que los animales testigos, los cuales fueron inoculados tardíamente, presentan una menor reactividad en comparación con los animales inoculados al inicio de la experiencia.

En paralelo estas muestra se suero se analizaron con las técnicas serológicas de rutina BPA y FPA (**Tabla 3**). Todas las muestras obtenidas antes de la inoculación (día 0) resultaron negativas para ambas pruebas. En el caso de las muestra de suero obtenidas al día 16 post-infección, para el animal 1 se obtuvo un resultado negativo para ambas pruebas, en concordancia con los resultados del glico-iELISA, mientras que para el animal 5 se obtuvo un resultado positivo por BPA y negativo por FPA. De los seis animales restantes, dos fueron positivos a BPA y FPA (animales 3 y 6), dos resultaron positivos sólo para BPA (animales 2 y 4) y dos negativos a ambas pruebas (animales 7 y 8). Al día 60 post-inoculación la muestra obtenida del animal 1 se mantuvo negativa para BPA y FPA mientras que por glico-iELISA resultó claramente positiva. Para el animal 5, se obtuvo un resultado negativo por BPA pero positivo por FPA. Las muestras obtenidas del resto de los animales resultaron positivas para ambas pruebas.

Tabla 3. Análisis por BPA y FPA de las muestras de suero obtenidas en la prueba de infección.

N° Animal	Día 0			Día 16			Día 60		
	BPA	FPA	Glico-iELISA	BPA	FPA	Glico-iELISA	BPA	FPA	Glico-iELISA
1 [^]	Neg.	68	0,25	Neg.	70	0,25	Neg.	80	1,1
2 [*]	Neg.	69	0,5	Pos.	75	0,76			
3	Neg.	72	0,7	Pos.	100	0,86	Pos.	126	1,23
4	Neg.	68	0,8	Pos.	75	0,57	Pos.	198	1,26
5 [^]	Neg.	71	0,7	Pos.	75	0,49	Neg.	96	1,09
6	Neg.	64	0,6	Pos.	95	0,94	Pos.	181	1,25
7	Neg.	64	0,7	Neg.	75	0,26	Pos.	121	1,21
8 [*]	Neg.	67	0,6	Neg.	78	0,86			

En rojo se muestran los valores positivos.

Valor de corte FPA, >85 mP.

* Animales muertos al día 16 de la experiencia.

[^] Animales testigos inoculados al día 16.

Valor de corte glico-iELISA, ≥0,56 (valores relativizados al control positivo).

A los 60 días post-infección los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de bazo, hígado, linfonódulos gastro-esplénicos, inguinales superficiales, submaxilares y pre pectorales, como así también de timo, tonsila y sangre entera. A partir de estos órganos se realizó el cultivo en placas de modo directo por frotis en medio sólido selectivo, y en medio bifásico Ruiz-Castañeda para la sangre entera, luego se identificaron y contabilizaron las colonias obtenidas. En la **Tabla 4** se muestran los órganos analizados para cada uno de los animales y el número de colonias de *Brucella* sp. obtenidas. En todos los animales se logró aislar a la bacteria, resultando ser el bazo el órgano en el cual se contabilizó un mayor número de colonias, seguido por los linfonódulos gastroesplénicos y submaxilares. También se logró aislar a la bacteria a partir del timo de los animales 3 y 7.

Tabla 4. Aislamiento bacteriológico de *B. suis* a partir de muestras de órganos o tejidos obtenidas de los animales infectados.

Órgano o tejido ^a	N° Animal					
	1	3	4	5	6	7
Bazo	2237	7766	552	1440	40	1145
Hígado	17	9	5	17	2	40
Linfonódulos Gastro-esplénicos	239	634	132	-	72	916
Linfonódulos inguinales superficiales	0	9	5	14	10	25
Linfonódulos submaxilares	1	∞	29	20	553	2200
Linfonódulos pre-pectorales	0	6	2	-	-	18
Timo	-	11	-	-	0	∞
Tonsila	-	-	-	-	-	∞
Sangre entera	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.

^a Muestras de órganos o tejidos obtenidas a los 60 días post-infección.

∞, indica aislamiento positivo con un número incontable de colonias.

-, indica que no se obtuvo la muestra.

NEG, indica aislamiento negativo; POS, indica aislamiento positivo.

5.1.2.2 Prueba de inmunización en cerdos

Para evaluar la *performance* del ensayo de glico-iELISA en animales inmunizados, se inocularon 12 animales con la cepa *B. suis* 1330 inactivada por tratamiento térmico, 60°C, una hora, a una dosis de 5×10^9 bacterias, por vía intramuscular. Pre-inoculación y a los 30 días post-inoculación se extrajo sangre de los animales y se analizaron los sueros mediante el ensayo de glico-iELISA como así también por BPA y FPA. Los resultados obtenidos se muestran en el diagrama *dot plot* de la Figura 5 y en la **Tabla 5**. A los 30 días post-inmunización se observa un incremento estadísticamente significativo en los niveles de anticuerpos anti AcrA-AgO9 respecto a los sueros obtenidos previo a la inmunización. A los sueros pre-inmunización se les realizó solo la prueba de BPA, ya que resultaron todos negativos, y a las muestras obtenidas a los 30 días post-inmunización, se les realizó BPA y FPA, resultando este último solo positivo para los sueros 9 y 11, mientras que por BPA todas las muestras resultaron positivas.

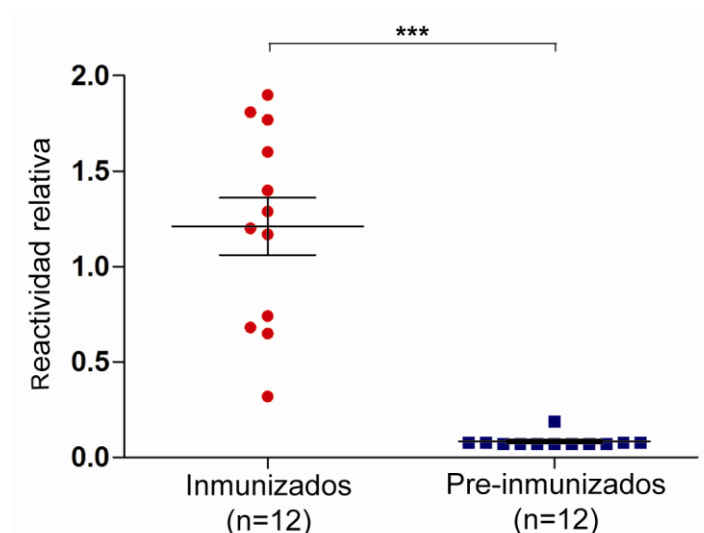


Figura 5. Análisis por glico-iELISA de las muestras de suero obtenidas en la prueba de inmunización. Se inmunizaron 12 animales con 5×10^9 bacterias de *B. suis* inactivadas por tratamiento térmico por vía intramuscular. Pre-inoculación (pre-inmunizados) y a los 30 días post-inoculación (inmunizados) se extrajeron las muestras y se analizaron por glico-iELISA como se indica en Materiales y Métodos. *** $P < 0,0001$, Mann-Whitney test. Todos los sueros se relativizaron con el control positivo.

Tabla 5. Análisis por BPA, FPA y glico-iELISA de las muestras de suero obtenidas en la prueba de inmunización.

N° Suero	Pre-inmunización (día 0)		Post-inmunización (día 30)		
	BPA	Glico-iELISA	BPA	FPA	Glico-iELISA
1	Neg.	0,07	Pos.	70	0,32
2	Neg.	0,07	Pos.	67	1,40
3	Neg.	0,07	Pos.	72	1,29
4	Neg.	0,07	Pos.	83	1,81
5	Neg.	0,07	Pos.	52	1,20
6	Neg.	0,07	Pos.	71	0,68
7	Neg.	0,08	Pos.	68	0,74
8	Neg.	0,07	Pos.	74	1,17
9	Neg.	0,08	Pos.	106	1,90
10	Neg.	0,08	Pos.	73	0,65
11	Neg.	0,08	Pos.	90	1,77
12	Neg.	0,19	Pos.	75	1,60

En rojo se indican los resultados positivos.

Valor de corte FPA, >85 mP.

Valor de corte glico-iELISA, $\geq 0,56$ (valores relativizados al control positivo).

5.1.3 Validación del glico-iELISA

Con el objetivo de validar el ensayo de glico-iELISA para el diagnóstico serológico de brucelosis en porcinos se analizaron dos grupos de muestras. Las muestras del primer grupo fueron obtenidas de animales pertenecientes a un establecimiento con al menos un animal con aislamiento positivo para *B. suis* (**Grupo I**). El segundo grupo incluye muestras de suero con serología positiva para brucelosis porcina, tanto por BPA como FPA, y muestras negativas por ambas técnicas serológicas (**Grupo II**).

5.1.3.1 Análisis muestras Grupo I

En este grupo se obtuvieron muestras de sangre y linfonódulos durante la faena de 5 cerdos los cuales previamente mostraron signos de la enfermedad. Estas muestras se sembraron en dos tipos de medio, en botellas con medio bifásico de Ruiz Castañeda y en placas de TSA suplementadas con los antibióticos correspondientes. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 6**. A partir de la sangre del animal número 2 y de los linfonódulos de los animales 1 y 2 se aislaron colonias con morfología y apariencia compatible con bacterias del género *Brucella*. Para identificar el género y especie de la bacteria aislada, se decidió realizar una PCR Multiplex utilizando como templado el ADN genómico de cepas previamente caracterizadas (stock del laboratorio) y de la muestra a tipificar (sangre del animal 2). Los resultados obtenidos (**Figura 6**) demuestran que la cepa aislada es *B. suis* biotipo 1, debido a que la muestra presenta el mismo patrón de bandas que el de *B. suis* 1330 biotipo 1.

Tabla 6. Aislamiento bacteriológico de las muestras obtenidas durante la faena de 5 cerdos con signos previos de brucelosis.

N° Animal	Sexo	Sangre	Linfonódulo retromamario	Linfonódulo submaxilar	Linfonódulo inguinal superficial
1	H	Negativo	Negativo	Positivo	-
2	H	Positivo	Negativo	Positivo	-
3	H	Negativo	Negativo	Negativo	-
4	H	Negativo	Negativo	Negativo	-
5	M	Negativo	-	Negativo	Negativo

- No se recolectaron las muestras indicadas. En rojo se remarcan los resultados positivos.

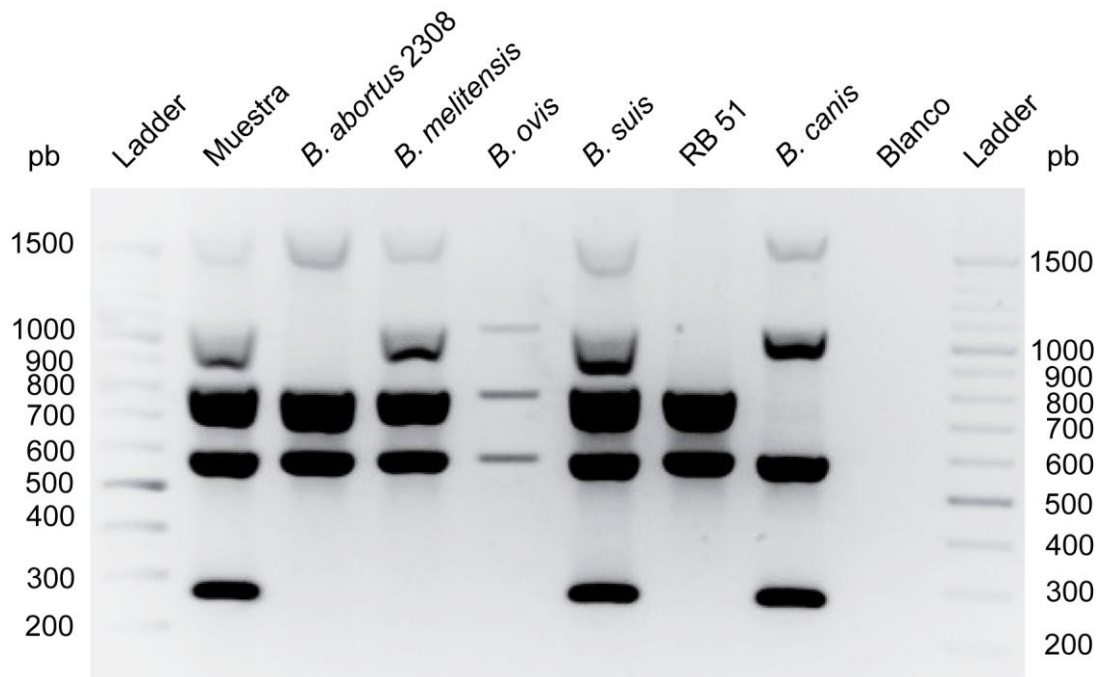


Figura 6. Tipificación por PCR Multiplex de la cepa aislada. Se realizó la extracción del ADN genómico de las cepas patrón de *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M, *B. ovis* Reo 198, *B. suis* 1330, *B. abortus* RB51, *B. canis* R6/66 y de la muestra aislada. Sobre este material se realizó la PCR multiplex y los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Muestra, corresponde al animal n° 2.

El aislamiento de *B. suis* en uno de los cinco animales indica que dicho patógeno se encontraba circulando en la piara, razón por la cual decidió localizar y analizar a los animales convivientes (expuestos), siendo estos un total de 26, y se les realizó la extracción de sangre. Las muestras de suero obtenidas se analizaron por el ensayo de glico-iELISA.

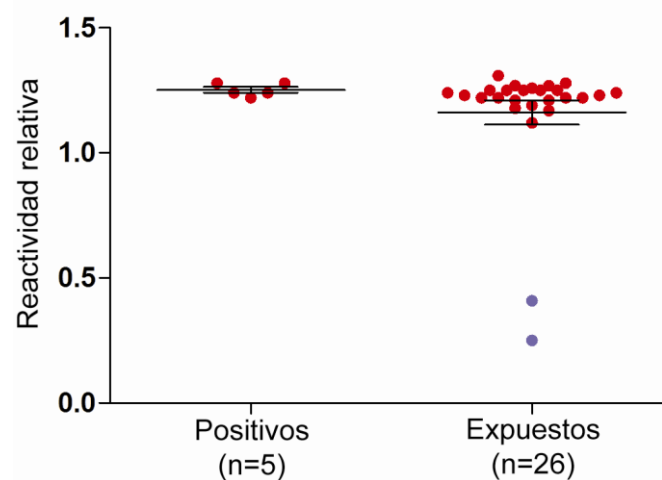


Figura 7. Análisis por glico-iELISA de las muestras de sueros del Grupo I. Se analizaron las muestras obtenidas de los 5 animales enviados a faena, de los cuales 2 presentaron aislamiento positivo, pero solo uno se confirmó por tipificación molecular, resultando positivo a *B. suis* biotipo 1. También se analizaron 26 muestras obtenidas de los animales convivientes (expuestos). Los datos se relativizaron con respecto al control positivo.

Como se puede observar en la **Figura 7**, los 5 animales enviados a faena, de los cuales dos presentaron aislamiento positivo, presentaron altos niveles de anticuerpos anti AcrA-AgO9. El análisis del grupo de animales expuestos mostró que 24 animales presentan valores por glico-iELISA similares a los del grupo de animales positivos, mientras que dos animales presentaron niveles menores de reactividad (animales 3 y 10). Estos resultados concuerdan con los con los obtenidos por BPA y FPA, como se pueden observar en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Análisis por BPA, FPA y glico-iELISA de las muestras del Grupo I.

	Nº Animal	BPA	FPA	Glico-iELISA
Positivos	1	Positivo	175	1,22
	2	Positivo	230	1,24
	3	Positivo	247	1,28
	4	Positivo	258	1,24
	5	Positivo	187	1,24
Expuestos	1	Positivo	250	1,25
	2	Positivo	126	1,18
	3	Negativo	72	0,41
	4	Positivo	254	1,25
	5	Positivo	126	1,12
	6	Positivo	148	1,22
	7	Positivo	235	1,25
	8	Positivo	273	1,22
	9	Positivo	250	1,22
	10	Negativo	67	0,25
	11	Positivo	257	1,24
	12	Positivo	230	1,25
	13	Positivo	120	1,21
	14	Positivo	265	1,27
	15	Positivo	270	1,26
	16	Positivo	235	1,17
	17	Positivo	103	1,19
	18	Positivo	215	1,21
	19	Positivo	265	1,22
	20	Positivo	253	1,23
	21	Positivo	153	1,24
22	Positivo	255	1,27	
23	Positivo	230	1,31	
24	Positivo	143	1,23	
25	Positivo	235	1,25	
26	Positivo	242	1,28	

En rojo se indican los resultados positivos.

Valor de corte FPA, >85 mP.

Valor de corte glico-iELISA, ≥0,56 (valores relativizados al control positivo).

5.1.3.2 Análisis muestras Grupo II

En este grupo se analizaron por glico-iELISA 418 muestras de suero previamente caracterizadas por las técnicas serológicas de BPA y FPA, de las cuales 130 resultaron positivas y 288 negativas por ambas técnicas serológicas. Las muestras negativas fueron a su vez sub-clasificadas en tres grupos, a saber: muestras obtenidas de animales provenientes de establecimientos con antecedentes de brucelosis (n=76), muestras obtenidas de cerdos provenientes de establecimientos sin historial de enfermedad (n=32) y muestras obtenidas de cerdos de Canadá, país libre de Brucelosis (n=180).

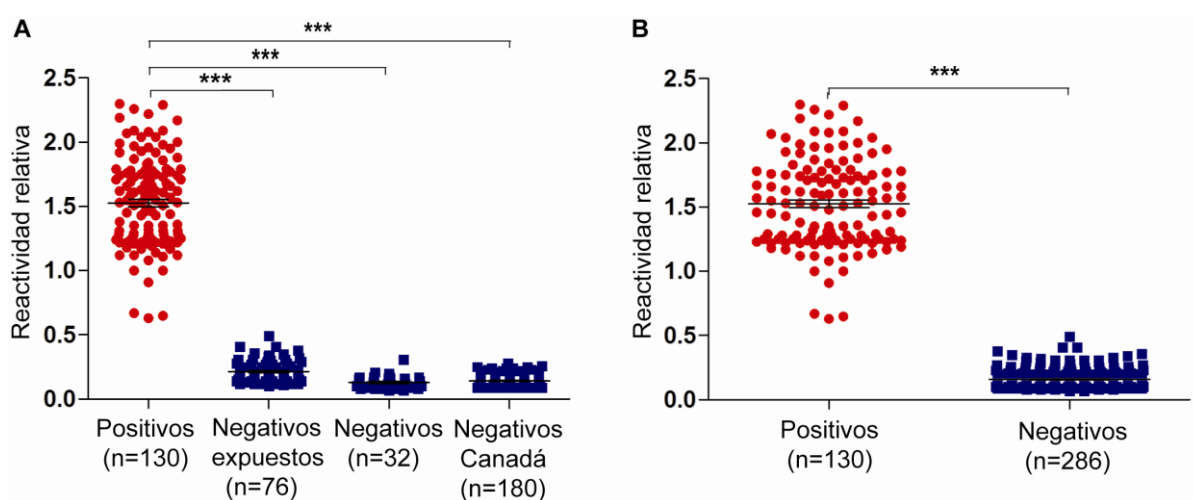


Figura 8. Análisis por glico-iELISA de las muestras de sueros del Grupo II. A) *Dot plot* de los resultados obtenidos al analizar 130 muestras de suero obtenidas de animales con serología positiva por BPA y FPA, 286 muestras negativas sub-clasificadas en tres grupos diferentes. B) *Dot plot* de los resultados obtenidos agrupando todas las muestras negativas. Entre paréntesis se indica el número de muestras analizadas. *** $P < 0,0001$ Mann-Whitney test.

En la **Figura 8A** se puede observar que existe una diferencia significativa entre el grupo de sueros positivos y cada uno de los grupos de sueros negativos (sueros negativos expuestos, negativos y negativos Canadá. Además, los grupos negativos no difieren entre sí, por lo tanto, se decidió agrupar a todos los sueros negativos y repetir el análisis (**Figura 8B**). Con este nuevo análisis, se observa que ambos grupos de sueros no presentan solapamiento y la diferencia entre ellos se mantiene estadísticamente significativa.

Para evaluar la performance diagnóstica del glico-iELISA en términos de sensibilidad y especificidad diagnóstica como así también determinar los valores *cut-off* que optimizan la

sensibilidad y especificidad, se realizó un análisis por curvas ROC (*Receiver-operating characteristic analysis*) (**Figura 9**). Dicho análisis mostró que el área bajo la curva (AUC) para este test fue de 1 (IC del 95%; 1,000 a 1,000) y el valor de *cut-off* que optimiza simultáneamente la sensibilidad y la especificidad es de 0,56; resultando en una sensibilidad diagnóstica de 1 (IC del 95%, 0,9872 a 1,000) y especificidad de 1 (IC del 95%, 0,9720 a 1,000).

Los resultados obtenidos indican que el glico-ELISA desarrollado en el presente trabajo permite discriminar claramente animales positivos de negativos con valores óptimos de sensibilidad y especificidad.

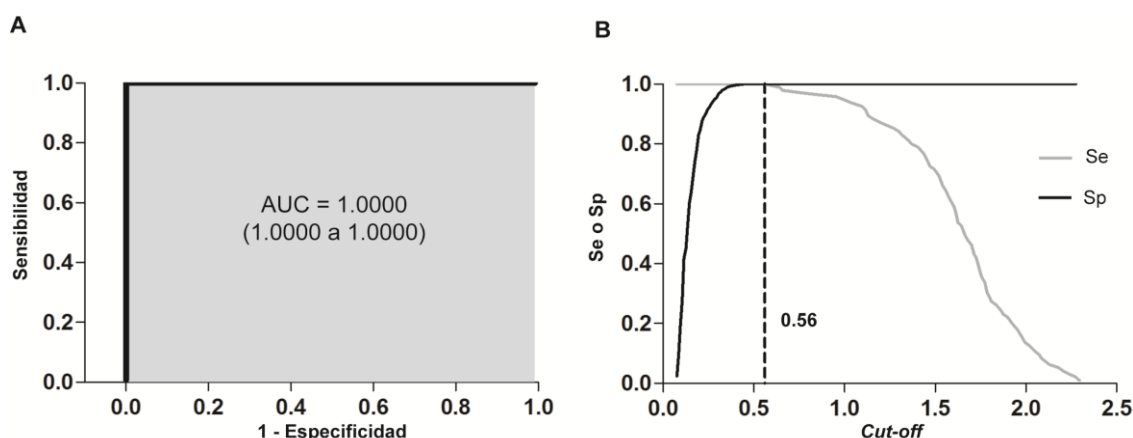


Figura 9. Análisis ROC de los resultados obtenidos por glico-iELISA. A) Curva ROC. El análisis se realizó con 130 muestra de suero positiva sor BPA y FPA y 286 muestras negativas por ambas técnicas serológicas. A). AUC, área bajo la curva ROC. Los valores entre paréntesis indican un intervalo de confianza del 95%. B) Curva de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) en función de todos los valores posibles de *cut-off*. La línea de rayas vertical indica el valor de *cut-off* que optimiza concurrentemente la sensibilidad y especificidad ($cut-off=0,56$; $Se=1$, $Sp=1$).

Finalmente, se analizó un grupo de muestras de suero problemáticas que presentaron resultados discordantes en las dos técnicas serológicas actualmente en uso, BPA y FPA.. Estas muestras no se incluyeron en el análisis anterior debido a que no cumplen con el criterio establecido para clasificarlas como positivas o negativas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8**. Las muestras 7, 8 y 9, resultaron negativas a BPA y positivas al FPA, al glico-iELISA y al Western blot. Las muestras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 resultaron todas positivas a BPA y negativas a FPA, de las cuales, las muestras 1, 3 y 4 resultaron positivas al glico-iELISA, mientras que las muestras 2, 5 y 6 resultaron negativas a esta prueba. Con respecto al ensayo de Western blot solo la muestra 2 resulto negativa, mientras que el resto de las muestras, resultaron positivas a este ensayo.

Tabla 8. Análisis por BPA, FPA, glico-iELISA y Western blot (WB) de muestras de suero serológicamente positivas por BPA o FPA.

Nº Muestra	BPA	FPA ^a	Glico-iELISA ^b	Western blot ^c
1	Pos.	55	0,81	Pos.
2	Pos.	59	0,22	Neg.
3	Pos.	69	0,95	Pos.
4	Pos.	76	0,88	Pos.
5	Pos.	79	0,54	Pos.
6	Pos.	65	0,52	Pos.
7	Neg.	137	1,94	Pos.
8	Neg.	185	0,98	Pos.
9	Neg.	202	2,20	Pos.

^aValor de corte FPA, >85 mP.

^bValor de corte glico-iELISA, ≥0,56 (valores relativizados al control positivo).

^cEnsayo de Western blot utilizando como antígeno la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9.

En rojo se indican los resultados positivos. SD, indica sin dato.

5.2 PARTE II: Desarrollo, optimización y validación de un inmunoensayo de fluorescencia utilizando como antígeno la glicoproteína AcrA-AgO9 inmovilizada sobre micropartículas magnéticas (FMBIA, *fluorescent magnetic microbeads-based immunoassay*) para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina.

5.2.1 Optimización del inmunoensayo

Con el objetivo de desarrollar una nueva plataforma para el diagnóstico serológico de brucelosis porcina se utilizaron partículas superparamagnéticas como soporte de la reacción. Este ensayo se basa en la unión covalente entre las aminos libres del antígeno AcrA-AgO9 con el grupo carboxilo que se encuentra sobre la superficie de las micropartículas. Dicho antígeno es reconocido por los anticuerpos específicos que se encuentran en los sueros a analizar. La reacción se visualiza mediante el agregado de un anticuerpo anti-IgG porcina conjugado a un fluoróforo. El uso de partículas magnéticas presenta ciertas ventajas, como tiempos de incubación reducidos, la posibilidad de usar sangre entera como muestra, sin la necesidad de centrifugas, ni equipamiento para el procesado de la muestra, también los lavados son más eficientes debido a que se utilizan racks magnéticos sin tener que centrifugar y el potencial de ser utilizadas para el diagnóstico *in situ*.

Para optimizar la cantidad de antígeno a inmovilizar sobre las micropartículas, se ensayaron cuatro cantidades de antígeno: 2,0, 1,0, 0,5 y 0,25 µg/reacción en un volumen final de 500 µl y dos diluciones de suero (1/100 y 1/200) con cinco sueros diferentes ensayados previamente en el glico-iELISA: positivo fuerte, positivo medio, positivo débil, y 2 sueros negativos (**Figura 10**). En base a la relación entre el suero positivo débil y el suero negativo alto (suero negativo 1), la cantidad óptima de antígeno por reacción resultó en 2 µg por reacción. La relación que se obtuvo en las diluciones 1/100 y 1/200, resultaron similares por lo que se decidió utilizar la dilución 1/200.

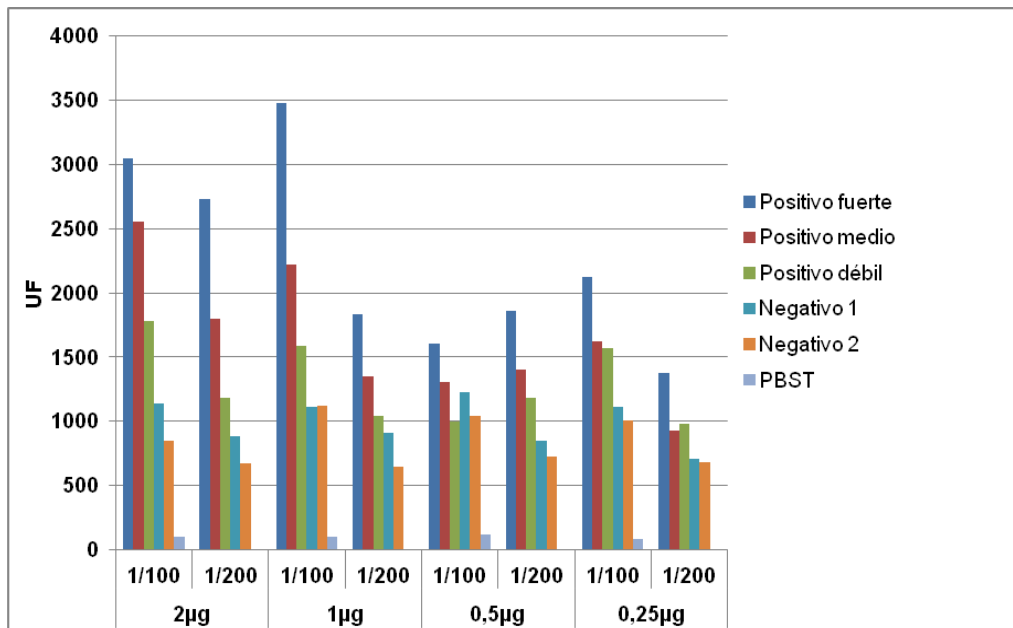


Figura 10. Optimización de la cantidad de AcrA-AgO9 a inmovilizar sobre las micropartículas magnéticas. Se evaluaron distintas concentraciones de antígeno AcrA-AgO9 (2 µg, 1 µg, 0,5 µg y 0,25 µg/ reacción) a inmovilizar sobre las partículas magnéticas. Las mismas se incubaron con dos diluciones de los sueros (1/100 y 1/200), se lavaron y se incubaron con los anticuerpos anti-IgG de cerdo conjugados con DyLight 650 (dilución 1/1.000). La medición de fluorescencia se realizó en un fluorómetro. UF: Unidades de Fluorescencia.

Debido a los altos valores de reactividad que presentaron algunos sueros negativos, se decidió evaluar distintos agentes bloqueantes. Para ello, se comparó la respuesta de los sueros positivos y varios sueros negativos con las micropartículas bloqueadas con gelatina de pescado o BSA al 1%. Como se muestra en la **Figura 11**, el bloqueo con BSA incrementa la señal de fluorescencia obtenida con los sueros positivos y a la vez disminuye la señal de fondo de los sueros negativos. Por lo tanto, se decidió bloquear las micropartículas con BSA.

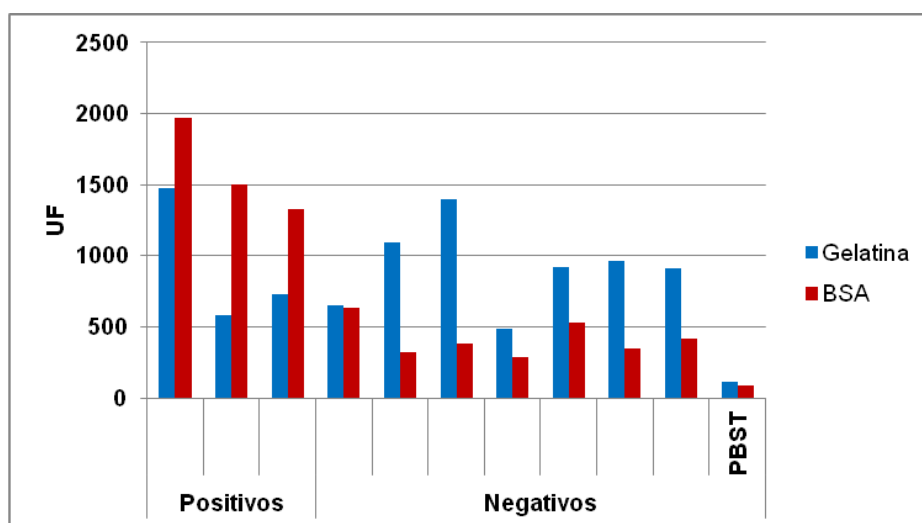


Figura 11. Optimización del bloqueo de las micropartículas. Se utilizaron sueros positivos, y sueros negativos a las técnicas serológicas de BPA, FPA y ELISA, y se realizó la prueba de fluorescencia con micropartículas bloqueadas con Gelatina o con BSA. UF: Unidades de Fluorescencia.

En trabajos previos del laboratorio se observó que disminuyendo los tiempos de incubación de la micropartículas funcionalizadas con las muestra de suero y con el conjugado, mejoraba la *performance* del ensayo. Por esta razón, se probaron distintos tiempos de incubación (5, 15, 30 y 60 minutos).

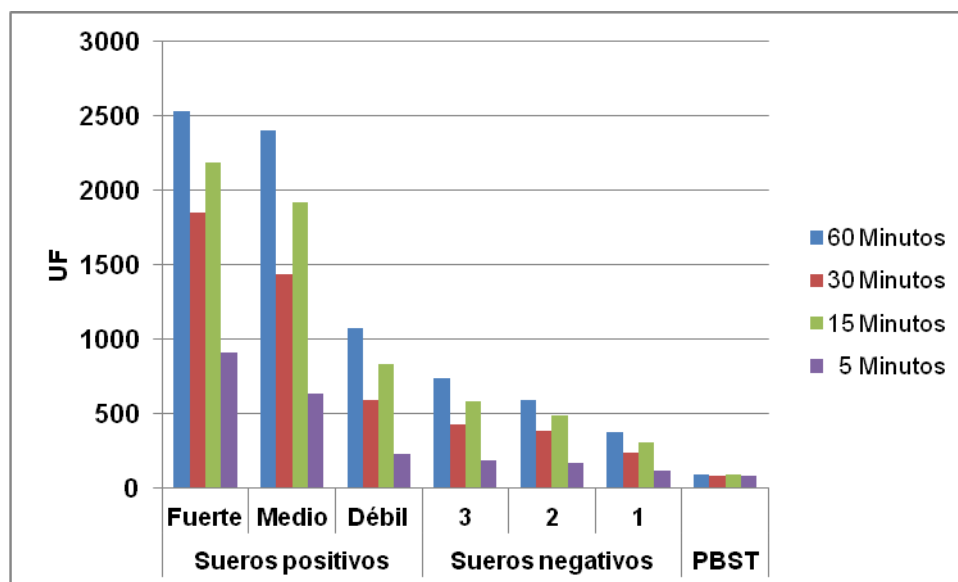


Figura 12. Optimización de los tiempos de incubación. Se analizaron tres sueros positivos y negativos (fuertes, medios y débiles) a las técnicas serológicas de BPA, FPA y ELISA, y se realizó la prueba con micropartículas a tiempos distintos de incubación tanto de los sueros como del conjugado.

Como se puede observar en la **Figura 12**, a los 15 minutos de incubación, se obtiene la mejor relación tanto entre el suero positivo débil y el negativo fuerte (suero negativo 3).

En conjunto estos resultados indican que las condiciones óptimas del ensayo son: a) cantidad de AcrA-AgO9 por reacción: 2 µg, b) agente bloqueante: BSA, c) dilución de la muestra: 1/200, d) dilución del conjugado: 1/1000, e) tiempo de incubación con la muestra y el conjugado: 15 min.

5.2.2 Validación del ensayo

Como prueba de concepto se analizó un panel reducido de 47 muestras positivas por BPA y FPA, y 44 muestras negativas utilizando las condiciones de reacción establecidas en el punto anterior. Los resultados obtenidos muestran que las poblaciones positivas y negativas se pueden diferenciar claramente mostrando un leve solapamiento entre las mismas.

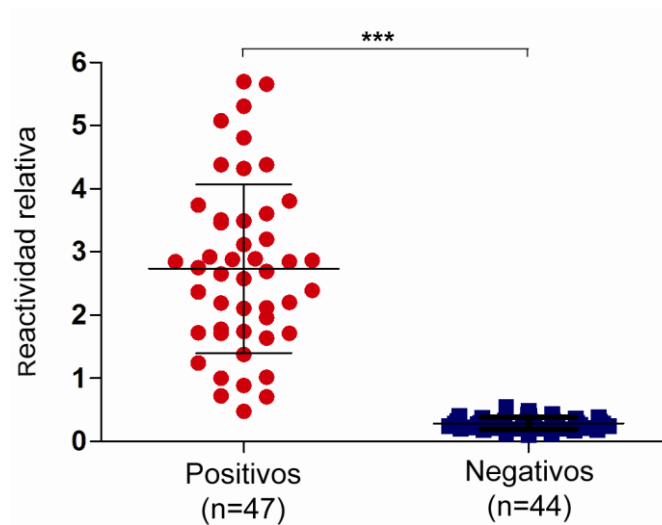


Figura 13. Análisis por FMBIA. Se analizaron 47 muestras de suero positivas y 44 negativas empleando micropartículas magnéticas covalentemente unidas al antígeno AcrA-AgO9. Los anticuerpos reaccionantes se detectaron mediante la incubación con anticuerpos anti-IgG de cerdo conjugados con el fluoróforo DyLight 650. Los resultados se relativizaron con respecto al control positivo. Entre paréntesis se indica el número de muestras analizadas. *** $P < 0,0001$ Mann-Whitney test.

Para evaluar a *performance* diagnóstica del FMBIA se realizó un análisis por curvas ROC. Este análisis determinó que el área bajo la curva (AUC) ROC es de 0,9990 (IC del 95% 0,9994 a 1,0002) (**Figura 14A**). El análisis de sensibilidad y especificidad en función de los valores de *cut-off* nos permitió determinar que para el valor de *cut-off* = 0,46 se obtiene una sensibilidad diagnóstica de 0,95445 (IC del 95% 0,8453-0,9944) y una especificidad de 1 (IC del 95% 0,9245-1,0000), y para el valor de *cut-off* = 0,63 una sensibilidad diagnóstica de 1 (IC del 95%, 0,9196-1,0000) y especificidad de 0,9787 (IC del 95%, 0,8871-0,9995); siendo este último el valor de *cut-off* que maximiza la sensibilidad y especificidad (**Figura 14B**).

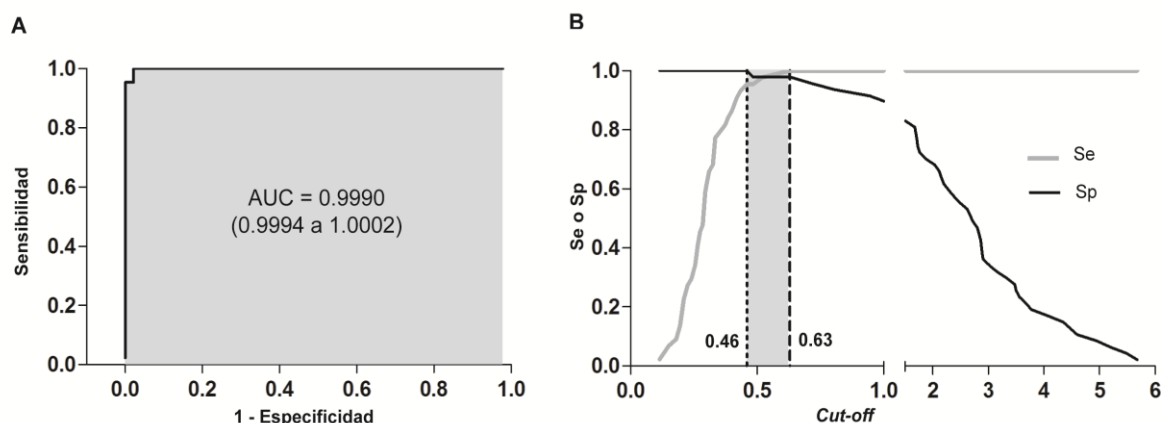


Figura 14. Análisis ROC de los resultados obtenido por FMBIA. A) Curva ROC. Se analizaron 47 muestras positivas y 44 negativas. AUC, área bajo la curva. Los valores entre paréntesis indican el intervalo de confianza del 95%. B) Curva de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) en función de todos los valores posibles de *cut-off*. La línea de puntos indica el valor de *cut-off* para el cual se obtiene la máxima especificidad (*cut-off*=0,46; Se=0,9545; Sp=1,0000) y la línea de rayas indica el valor de *cut-off* para el cual se obtiene la máxima sensibilidad (*cut-off*=0,63; Se=1,0000; Sp=0,9787), y optimiza concurrentemente la sensibilidad y especificidad.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el inmunoensayo FMBIA es altamente sensible y específico, ya que discrimina claramente entre animales infectados y no infectados, para el diagnóstico de brucelosis porcina.

6. Discusión

6.1 Problemática del diagnóstico de la brucelosis en el cerdo

En Argentina, la brucelosis porcina es una enfermedad subdiagnosticada. Se desconoce cuál es la prevalencia en el territorio nacional pero un muestreo realizado por SENASA en el año 1999 arrojó una prevalencia individual aproximada del 4%. Sin embargo, estas cifras no parecieran reflejar con certeza la situación epidemiológica real. De acuerdo a la información publicada por el Ministerio de Salud de la Nación en el Boletín Epidemiológico Periódico, edición especial N° 33 (Castro HA. y col., 2006), las especies y cepas de *Brucella* spp. aisladas de material biológico humano, corresponden principalmente a *B. suis*, lo que indica que esta especie es el principal agente zoonótico causal de la brucelosis en humanos, al menos en la región central y pampeana. Por lo tanto se infiere que ninguna de las pruebas serológicas convencionales utilizadas actualmente para el diagnóstico individual de la brucelosis en el cerdo es totalmente confiable y esto probablemente se deba a la alta frecuencia de “falsos negativos” que arrojan esos test.

En el presente trabajo se desarrolló, optimizó y validó un test de Elisa indirecto, denominado glico-iELISA, donde se utilizó el antígeno recombinante AcrA-AgO9. Este ensayo se validó utilizando paneles de sueros caracterizados previamente por las técnicas serológicas convencionales, BPA y FPA. Utilizamos como criterio de inclusión para el agrupamiento de sueros positivos que los mismos resultaran positivos para ambas pruebas, y el criterio de inclusión para la categoría de sueros negativos, fue que ambas pruebas resultaran negativas. Como ninguna de las muestras utilizadas poseían confirmación diagnóstica por aislamiento microbiológico del agente causal es que se decidió realizar un ensayo de infección experimental, con el objeto de obtener sueros de referencia que nos permitieran validar el glico-iELISA. El rendimiento diagnóstico del glico-iELISA, fue óptimo. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para un valor de corte de 0.56. Los resultados obtenidos demuestran que el ensayo permite discriminar claramente animales positivos de negativos.

Adicionalmente, se utilizó al antígeno AcrA-AgO9 para el desarrollo de una prueba de concepto de un test inmunomagnético, basado en el uso de micropartículas magnéticas, con detección de fluorescencia. Para este test se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97,87% para un valor de corte preliminar de 0,63.

Estos datos, sumados a los obtenidos con el ensayo de glico-iELISA, demuestran que la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 es un excelente antígeno para el desarrollo de diagnósticos de *B. suis* de alta performance que permitan discriminar claramente animales infectados de no-infectados.

6.2 Análisis de muestras problema

Un pequeño grupo de nueve (9) sueros (ver **Tabla 8**, Resultados) fue excluido del análisis para validar el glico-iELISA, debido a que no cumplía con el criterio de clasificación de BPA y FPA positivos o negativos a ambas pruebas. El grupo de los sueros 1, 2, 3, 4, 5 y 6 resultaron positivos a BPA negativos a FPA; esto se podría explicar por el extenso periodo de incubación de la enfermedad, la continua o intermitente bacteriemia y la concentración de diferentes isotipos de inmunoglobulinas presentes en las muestras. Los sueros 1, 3 y 4 (BPA positivos y FPA negativos), resultaron positivos en el glico-iELISA y presentaron reactividad contra el AgO9 en la prueba de Western blot, lo que indica que corresponden a animales positivos para brucelosis porcina que arrojaron falsos negativos para el FPA. Se puede concluir de estos datos que el glico-iELISA es un inmunoensayo más sensible que el FPA para la detección de brucelosis porcina. El suero 2 resultó negativo a FPA, glico-ELISA y Western blot, observándose congruencia entre ambas pruebas, por lo que se puede concluir que resultó ser un falso positivo del BPA. Con respecto a los sueros 5 y 6, resultaron negativos por FPA y por glico-ELISA aunque en este último test presentaron valores muy cercanos al punto de corte. Sin embargo, estos sueros resultaron reactivos en el inmunoensayo de Western blot, por lo que se puede inferir que, al ser animales convivientes de una piara donde se detectaron animales positivos, estos resultados de glico-iELISA cercanos al valor de corte indiquen una infección reciente donde hay títulos detectables de IgM, pero aún bajos títulos de IgG, que expliquen el resultado positivo al BPA. De ser así, es factible que la toma de muestras en un período posterior, luego del aumento de los títulos de IgG, resulten en seroconversión al FPA y glico-iELISA.

El otro grupo de sueros, 7, 8 y 9, que provienen del mismo establecimiento que el anterior grupo, resultaron todos negativos al BPA y positivos al FPA, glico-iELISA y Western blot. Este falso negativo del BPA puede indicar la falta de aglutinación por altos títulos de IgG, que generen el fenómeno de “prozona” y por ende resulten en “falsos negativos”.

6.3 Ventajas de la utilización de AcrA-AgO9 para el diagnóstico de *B. suis*.

La principal ventaja del uso del glicoconjugado recombinante AcrA-AgO9 como antígeno para el inmunodiagnóstico de brucelosis porcina es que, debido a su alta sensibilidad y especificidad, permite identificar individualmente a los animales infectados, algo difícil de lograr actualmente con los test inmunológicos de uso corriente que están recomendados por OIE como test válidos para el diagnóstico poblacional (OIE, 2012). El uso de inmunodiagnósticos de alta performance como el glico-iELISA permitiría detectar y descartar puntualmente los animales positivos de una piara, y de este modo aplicar estrategias de saneamiento con el objeto de controlar y eventualmente erradicar la enfermedad, de establecimientos, áreas o países, impactando en una mayor productividad pecuaria y un menor riesgo para la salud pública.

Otra ventaja que diferencia a este test diagnóstico de los convencionales, es que la tecnología de glicoingeniería que se utiliza para producir el antígeno elimina la necesidad de purificar el LPS de *B. suis*, lo cual elimina la necesidad de realizar el cultivo del patógeno con los riesgos que esto implica. A su vez se elimina también la necesidad de implementar tratamientos químicos para obtener el polisacárido O del LPS, técnica necesaria para producir el antígeno usado en el test de FPA. Con la tecnología de glicoingeniería recombinante, el proceso de glicosilación y la longitud de la cadena del polisacárido O es controlado in vivo. Por lo que este sistema permite la producción de lotes homogéneos y estandarizados del antígeno, y esto es sumamente importante ya que la homogeneidad, pureza y estabilidad del antígeno es una condición fundamental para la estandarización y reproducibilidad de las pruebas diagnósticas.

6.4 Perspectivas futuras

Es importante mencionar que existen trabajos previos que utilizan este mismo antígeno (AcrA-AgO9) para el diagnóstico de brucelosis en humanos, en bovinos y actualmente se está trabajando en caprinos. En todos estos casos se han obtenido resultados que indican una alta especificidad y sensibilidad diagnóstica (Ciocchini AE. y col., 2013). Estos resultados, sumados a los presentados en esta tesis sugieren que la glicoproteína recombinante AcrA-AgO9 podría ser utilizado como antígeno universal para el diagnóstico de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*, las tres especies del género con mayor potencial zoonótico.

La utilización de nano o micropartículas magnéticas como soporte sólido del antígeno recombinante (AcrA-AgO9), aumenta notablemente la superficie disponible de interacción debido a su alta relación superficie/volumen como así también permite realizar las distintas incubaciones y lavados sin la necesidad de contar con centrifugas, sólo basta el uso de una gradilla imantada). A su vez, la detección por fluorescencia tiene la ventaja de no requerir un paso previo de incubación con sustrato y revelado. La utilización de estas nano o micropartículas, sumado al desarrollo de inmunobiosensores electroquímicos, que a diferencia de otros métodos, no requieren de personal altamente calificado, ni de un gran equipamiento, son de bajo costo y tienen una alta potencialidad para su miniaturización, permiten desarrollar plataformas de detección portátiles para el diagnóstico “*in situ*” (*point of care* – POC) de la enfermedad.

Otra de estas nuevas tecnologías, donde ya está siendo probado el antígeno AcrA-AgO9, es el inmunoensayo “*lateral flow*” o inmunoensayo de flujo lateral, también conocido como ensayo de inmunocromatografía o tira reactiva.

Ambos desarrollos ofrecen una gran ventaja, que es la de cubrir necesidades diagnósticas en áreas donde la infraestructura y el personal calificado son mínimos o inexistentes, y para el caso particular de nuestro país donde, debido a la gran extensión del mismo, las infraestructuras adecuadas y el personal calificado para proporcionar el diagnóstico necesario, se encuentran alejadas de las áreas rurales. Es por esto que el desarrollo de este tipo de plataformas para el diagnóstico *in situ* son útiles para un diagnóstico rápido.

Respecto al glico-iELISA, en una segunda etapa para la validación de este test, se realizará diagnóstico con muestras provenientes de áreas de producción porcina de la Argentina, con el objeto de aumentar el tamaño de muestra y obtener un valor de corte bien representativo de la situación epidemiológica del país.

Asimismo, es importante evaluar mediante el potencial problema de reactividad cruzada con *Yersinia enterocolitica*, debido a la similitud estructural del polisacárido O. Para tal fin proponemos realizar infecciones experimentales de cerdos con *Yersinia enterocolitica* por vía oral (simulando a la infección natural), y tomar muestra de suero a distintos tiempos post-infección para explorar la presencia y eventualmente los títulos de anticuerpos anti-AgO9.

7. CONCLUSIONES

- Se realizó un ensayo de infección experimental en cerdos con *Brucella suis*, cepa 1330, obteniéndose sueros positivos de animales con aislamiento bacteriológico.
- Se desarrollo (optimización y validación) una prueba de glico-iELISA para el diagnóstico de brucelosis en cerdos.
- Se desarrollo (optimización y validación), como prueba de concepto del antígeno AcrA-AgO9, un ensayo de fluorescencia con Micropartículas Magnéticas.
- Los resultados obtenidos demuestran, que este nuevo antígeno permite diferenciar claramente entre animales infectados y no infectados, logrando identificar con pruebas serológicas individualmente animales positivos y negativos.
- En conjunto estos resultados demuestran la posibilidad de utilizar el antígeno AcrA-AgO9 para el diagnóstico de la brucelosis porcina, en distintas plataformas, incluidas aquellas que nos permitan un diagnóstico *in situ*.

8. Bibliografía

- Acha, P., Szyfres, B.; (1986). "Zoonosis y enfermedades trasmisibles comunes al hombre y a los animales". Segunda Edición. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica. No. 503.
- Baldwin CL, G. R.; (2006). "Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacterium instruct the host to facilitate chronic infection?" Crit Rev Immunology 5: 407-442.
- Boffil, P.; Rivas, A.; Ramirez, W.; Montañez, J.; Martinez, A.; Quincoses, T.; González, L. R.; Fustes, E.; (1989). "Manual de Enfermedades Infecciosas". Tomo I. Ed. I.S.A.C.H., M.E.S.
- Bossi P, Tegnell A, Baka A, Van Loock F, Hendriks J, Werner A, Maidhof H, Gouvras G.; (2004). Bichat guidelines for the clinical management of brucellosis and bioterrorism-related brucellosis. Euro Surveill 9:E15-16.
- Bundle DR, Perry MB.; (1985). Structure and serology of the *Brucella abortus* O antigen. Biochem Soc Trans 13: 980–982.
- Caroff M, Bundle DR, Perry MB.; (1984). Structure of the O-chain of the phenolphase soluble cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9. Eur J Biochem 139: 195–200.
- Castro H.A. GSR, Prat M.I.; (2005). Brucelosis: una revisión práctica Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 39:203-216.
- Castro, H.A.; González, S.R.; Prat, M.I.; Baldi, P.C;. (2006). "Detección de anticuerpos anti-*Brucella* spp. en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. Revista Argentina de Microbiología, vol. 38, núm. 2, abril, pp. 75-78 Asociación Argentina de Microbiología.

- Ciocchini AE., Rey Serantes DA., Melli LJ., Iwashkiw JA., Deodato B., Wallach J., Feldman MF., Ugalde JE., y Comerci DJ.; (2013). "Development and Validation of a Novel Diagnostic Test for Human Brucellosis Using a Glyco-engineered Antigen Coupled to Magnetic Beads"
- Ciocchini AE., Rey Serantes DA., Melli LJ., Guidolin LS., Iwashkiw JA., Elena S., Franco C., Nicola AM., Feldman MF., Comerci DJ. , Agosto 2014. "A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis", Vet Microbiology, Volume 172, Issues 3–4, 27, Pages 455–465.
- Corbel MJ.; (1997). Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis 3:213-221.
- Corbel M.J.; (2006). "Brucellosis in human and animals". Geneva, Switzerland.
- De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM.; (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. J Clin Microbiol 46:43-49. 16.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A.; (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 57:2688-2693.
- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC.; (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 187:2715-2726.
- Huddleson IFaHET.; (1929). The differentiation of the species of genus *Brucella*. Michigan State College Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 100:1–16.
- Iwashkiw J., Fentabil MA., Faridmoayer A., Mills DC., Peppler M., Czibener C., Ciocchini AE., Comerci DJ., Ugalde JE. y Feldman MF.; (2012). Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and

diagnostic tools directed against brucellosis Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis Microbial Cell Factories, 11:13.

- Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP.; (1997). The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? Emerg Infect Dis 3:83-94.
- Kohler S, F. V., Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M, Liautard JP.; (2002). "The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell." Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America **24**: 15711-6.
- Meikle PJ, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Bundle DR.; (1989). Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. Novel Brucella Strain (BO1) Associated with a Prosthetic Breast Implant Infection. Infect Immun 57: 2820–2828.
- Meyer KF, Shaw, E.B.; (1920). A comparison of the morphological, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. Studies on the genus *Brucella* nov. gen. J Infect Dis:173–184.
- Nielsen K., Gall D., Smith P., Vigliocco A., Perez B., Samartino L., Nicoletti P., Dajer A., Enright F.; (1999). Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. Vet. Microbiol. 68:245–253.
- Nusrat H.; (2004). Disease specific diagnostic methods and lymphokines in human brucellosis. University of Karachi.
- Organización Mundial de Sanidad animal (OIE 2012). "Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres"; capítulo 2.8.5.

- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV.; (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6:91-99.
- Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA.; (2005). Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. *Cell Microbiol* 7:1459-1473.
- Ray WC.; (1977). The epidemiology of *Brucella abortus*, p. 102–115. In Hidalgo RPCaRJ (ed.), *Bovine Brucellosis*. Texas A&M University Press, Texas.
- Rhaway, N. "Manual Merck de Veterinaria". España. (1993).
- Samartino LE.; (2002). Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 90:71-80.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kampfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Gollner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K.; (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:375-382.
- Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kampfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK.; (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:801-808.
- Seelke R.; (2007). The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. *Choice: Current Reviews for Academic Libraries* 45:68-68.
- Sreevatsan S., Bookout JB., Ringpis F., Perumaalla VS., Ficht TA., Adams LG., Hagius SD., Elzer PH., Bricker BJ., Kumar GK., Rajasekhar M., Isloor S., Barathur RR.; (2000). A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* 38:2602-2610. 54.

- Thorne ET.; (2001). Brucellosis, p. 372–395. Williams ES, Barker, I.K (ed.), Infectious Diseases of Wild Mammals, 3rd ed. Manson Publishing.
- Velasco J., Bengoechea JA., Brandenburg K., Lindner B., Seydel U., Gonzalez D., Zahringer U., Moreno E., Moriyon I.; (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. Infect Immun 68:3210-3218.
- 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.; (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). Int J Syst Evol Microbiol.;64(Pt 12):4120-8.

