Diagnóstico de brucelosis canina mediante un ELISA-indirecto utilizando LPS-*r* de *Brucella abortus* RB51

Canine brucellosis diagnosis by an indirect-ELISA using LPS-r from *Brucella abortus* RB51

María Ignacia Meza1, Patricio Retamal1,2, Consuelo Borie1,2, Alicia Valdés1, Pedro Abalos1,2

1 Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11735, La Pintana. Santiago, Chile. pabalos@uchile.cl

2 Red de Investigación en Zoonosis Emergentes y Re-emergentes

**Palabras clave**: Brucelosis canina, RB51, ELISA

**INTRODUCCIÓN:** El diagnóstico definitivo de la infección de caninos por *Brucella canis* se obtiene por aislamiento del agente desde tejidos o fluidos, sean estos productos del aborto, sangre o semen. Esta tarea resulta compleja, ya sea por la obtención de una muestra precisa y el acceso a un laboratorio especializado.

Por ello la detección de anticuerpos resulta útil para corroborar signos compatibles con la enfermedad, para estudios epidemiológicos en criaderos caninos, certificación pre-encaste y determinación del éxito de tratamientos. Existen diversas pruebas serológicas, siendo algunas de ellas de baja eficiencia diagnóstica, laboriosas y cuyos resultados se obtienen hasta en 72 horas. Los antígenos más utilizados corresponden a preparados solubles de *B. ovis* o *B. canis*, que contienen preferentemente lipopolisacárido rugoso (LPS-*r*) y algunas proteínas, dependiendo de su métodos de extracción, lo que incide en la especificidad de la prueba.

*Brucella abortus* RB51, es una cepa rugosa de fácil acceso, estable, que presenta menores problemas para su cultivo en gran escala, permitiendo una extracción más eficiente de antígenos purificados. Por otro lado un ELISA-indirecto permite una mejor estandarización, realizar un diagnóstico masivo, rápido y cuantitativo.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ELISA-indirecto, utilizando un antígeno altamente purificado obtenido de *B. abortus* RB51, para diagnóstico de brucelosis canina.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se cultivó *B. abortus* RB51 en caldo tripticasa soya a 37ºC por 48 hr, obteniéndose las células bacterianas, luego de tres lavados en agua destilada, mediante centrifugación. El paquete bacteriano fue desecado en acetona a 37ºC hasta peso constante. Las bacterias secas fueron sometidas a una extracción química del LPS-*r* mediante el método de Galanos modificado con etapas de sonicación. Finalmente se evaporaron los solventes, se suspendió el preparado en agua destilada, se dializó para eliminar el fenol y liofilizó. El antígeno se disolvió para su uso en una proporción de 1mg/mL en agua destilada.

El estudio incluyó 156 sueros de caninos sometidos a diagnóstico rutinario de brucelosis canina mediante la prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) que utiliza un antígeno soluble obtenido mediante extracción salina-caliente desde *B. ovis*. Ochenta y un sueros fueron positivos a CIEF, mientras que 75 fueron negativos a la prueba.

Se montó un ELISA-indirecto en el que se probaron tres tipos de placas de poliestireno, dos tampones de sensibilización del antígeno y dos temperaturas de sensibilización. Las diluciones de sueros y conjugado anti-IgG canina-peroxidasa (A9042 Sigma), en PBS 0,1M pH 7,2, fueron determinadas por titulaciones tipo *checkerboard* con sueros controles para la prueba de CIEF. Antes del ELISA las placas se bloquearon con seroalbúmina bovina al 2% en PBS y entre cada etapa se realizó tres lavados con mismo PBS más Tween 20 (0,5%). El volumen de trabajo fue de 100 uL. La reacción se reveló con ABTS 1mM y H2O2 4,4 mM en tampón citrato 0,05M, pH 4,5 +/- 0,05. La reacción se detuvo con SDS 4% y se leyeron las absorbancias con un filtro de 405 nm.

Las densidades ópticas (OD) fueron expresadas como porcentajes de positividad (PP) del control positivo para cada placa. Se consideró como mejor alternativa a aquella que entregó una diferencia entre sueros controles positivos/negativos (RA) mayor o igual a 4. Con esta alternativa de ELISA seleccionada se probaron los sueros caninos positivos y negativos a CIEF. La línea de corte o *cut-off* fue obtenida mediante el método ROC, estableciéndose la sensibilidad y especificidad respecto de CIEF. Mediante la prueba de McNemar se determinó asociación entre ELISA y CIEF y mediante el Índice *Kappa* de Cohen (*K*) el grado de concordancia entre ellas.

**RESULTADOS:** Se obtuvieron 117 mg de antígeno LPS-*r* de *B. abortus* RB51 purificado, el que fue diluido en una proporción de 1 mg/mL, conteniendo 0.45 ug de KDO.

El ELISA seleccionado se realizó con placa NUNC Polysorp, antígeno 1/100 diluido en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6, dilución de sueros 1/100, dilución de conjugado 1/9.000, la cual entregó un RA de 8,7.

El promedio de PP de los sueros positivos a CIEF fue de 93,4%, mientras que el de los negativos a CIEF fue de 30,2%. El *cut-off* fue de 65%, determinándose una sensibilidad de 97,5% y una especificidad de 97,3% para el ELISA desarrollado

Se demostró asociación entre ambas pruebas diagnósticas (p>0,05) y con un alto nivel de concordancia (*K*= 0,961).

**DISCUSIÓN:** El ELISA desarrollado con LPS-*r* altamente purificado alcanzó excelentes niveles de sensibilidad y especificidad. Como la eficiencia de una prueba diagnóstica depende en gran medida del tipo de antígeno y su calidad pensamos que nuestro ELISA sería más sensible y específico que CIEF, que se corrobora validando ambas pruebas con un número adecuado de sueros de animales infectados y no infectados. El ELISA propuesto es una buena alternativa a pruebas ya existentes.

**BIBLIOGRAFÍA**

* Abalos P, Pinochet L, Fábrega F. Desarrollo de una prueba de ELISA para descartar respuestas postvacunales con Cepa 19, utilizando un antígeno soluble polisacárido de *Brucella abortus* 1119-3. Av Cs Vet 1993, 8: 138-43.
* Barrouin-Melo SM, Poester FP, Ribeiro MB, De Alcantara AC, Aguiar PH, Nascimento IL, Schaer RE, Nascimento RM, Freire SM. Diagnosis of canine brucelosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. Res Vet Sci 2007 83: 340-6.
* De Oliveira MZ, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, Barrouin-Melo SM. Validation of an ELISA method for serological diagnosis of canine brucelosis due to *Brucella canis*. Res Vet Sci 2010 90:425-31.
* Escobar GI, Boeri EJ, Ayala SM, Lucero NE. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucelosis. Rev Argent Microbiol 2010 42: 35-40.