



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



EVOLUCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL LIPOPOLISACÁRIDO RUGOSO Y
PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE *Brucella abortus* Cepa RB51 EN PERRAS INFECTADAS CON
Brucella canis, DETECTADOS POR ELISA INDIRECTO.

DANIELA ALEJANDRA RUZ OÑATE

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE

2011



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



EVOLUCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL LIPOPOLISACÁRIDO RUGOSO Y
PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE *Brucella abortus* Cepa RB51 EN PERRAS INFECTADAS CON
Brucella canis, DETECTADOS POR ELISA INDIRECTO.

DANIELA ALEJANDRA RUZ OÑATE

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. PEDRO ÁBALOS P.
PROFESOR CONSEJERO: DR. PATRICIO RETAMAL M.
PROFESOR CONSEJERO: DRA. ALICIA VALDÉS O.

SANTIAGO, CHILE

2011

AGRADECIMIENTOS

A todos los que han confiado en mí, a todos los que han estado en mi vida y han ayudado a forjarme como persona.

A mi madre por su amor y confianza extrema en poder lograr las metas.

A todos mis compañeros y amigos del Centro de Salud Veterinaria El Roble, gracias a ellos soy gran parte de lo que soy ahora. Gracias Manu López, Guise Acuña, Fabián Espínola, Rodrigo Häfelin, Alejandra Sepúlveda, Luciano Pizarro, Tamara Rojas, Dani Bertolini, Pauli Santis, Cristián Stuardo, Clau Cruces, Felipe Oyarzún, señora Iris, Maca Astudillo, Paula Lillo.

A Nacho por su amistad incondicional y estar siempre cuando lo he necesitado.

A mi amiga Mary Meza por su apoyo e incontables horas de laboratorio.

A Milton por su amistad y gran aporte en el manejo del inglés.

A Fran Palovi por su alegría y darme tanta buena onda, un gran gusto haberla conocido.

A la tía Mari por su gran ayuda y apoyo.

Al doctor Pedro Ábalos por su paciencia y comprensión durante mi trabajo.

A Patricio Retamal por su simpatía y colaboración en mi tesis.

A la Academia Vaisnava de Cumming por todos los conocimientos que me ha entregado y su riqueza espiritual incomparable.

A mis amigos del Consultorio Veterinario Los Alerces por creer en mí y potenciar mis habilidades.

A la doctora Consuelo Borie por facilitarme los sueros para esta tesis.

A Esteriliza Chile por la gran oportunidad de poder pertenecer a sus filas.

Al doctor Carlos Robles por su ayuda en el cálculo de datos, ayuda fundamental para este estudio.

En fin, gracias a todos aquellos que hace rato están en mi vida y aquellos que recién están entrando.

"Nuestra tarea debe ser liberarnos a nosotros mismos ampliando nuestro círculo de compasión para abrazar en él a todas las criaturas vivientes y la totalidad de la naturaleza y su hermosura"

Albert Einstein

MEMORIA DE TÍTULO

“EVOLUCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL LIPOPOLISACÁRIDO RUGOSO Y PROTEÍNAS CITOSÓLICAS DE *Brucella abortus* Cepa RB51 EN PERRAS INFECTADAS CON *Brucella canis*, DETECTADOS POR ELISA INDIRECTO”.

“EVOLUTION OF ANTIBODIES AGAINST ROUGH LIPOPOLYSACCHARIDE AND CYTOSOLIC PROTEINS OF *Brucella abortus* Strain RB51 IN FEMALE DOGS INFECTED WITH *Brucella canis*, DETECTED BY AN INDIRECT ELISA”.

Daniela Alejandra Ruz Oñate *

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la evolución de anticuerpos caninos contra *Brucella canis*, de dos perras inoculadas experimentalmente, mediante un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA-I) usando como antígenos el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y proteínas citosólicas de *Brucella abortus* Cepa RB51. El objetivo fue discriminar el momento en que se hacen detectables los anticuerpos para cada ELISA-I y describir la evolución de éstos en el tiempo. Se utilizaron sueros de dos perras infectadas con *B. canis*, A y B, con un total de 20 y 16 muestras de sueros seriados, respectivamente. Para ambos ELISA-I se usaron líneas de corte obtenidas por metodología "Receiver-Operator Characteristic" (ROC), que determinaron la positividad o negatividad a la prueba. Ambos ELISA-I fueron capaces de detectar anticuerpos tempranamente y fue posible constatar su permanencia en el tiempo. La detección de anticuerpos mediante ELISA-I, tanto con antígeno de proteínas citosólicas como con antígeno LPS-R de *B. abortus* Cepa RB51, se mantuvo detectable, al menos, hasta la semana 38 post infección.

Palabras claves: *Brucella canis*; anticuerpo; antígeno; evolución.

ABSTRACT

This study describes the evolution of canine antibodies against *Brucella canis* from two female dogs experimentally inoculated, by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) using rough lipopolysaccharide (R-LPS) and cytosolic proteins of the *Brucella abortus* Strain RB51 as antigens. The aim was to differentiate at what time the antibodies are detectable for each ELISA-I and describe trends over time. Serums from two dogs infected with *B. canis* were used, A and B, with a total of 20 and 16 serial serum samples, respectively. For both I-ELISA cut-off lines obtained by "Receiver-Operator Characteristic" (ROC) methodology were used, which determined the positivity or negativity to the test. Both ELISA-I were able to detect antibodies early and it was possible to verify their permanence in time. The detection of antibodies through the ELISA-I, both the cytosolic protein antigen and the R-LPS antigen of *B. abortus* strain RB51, remained detectable, at least, until week 38 post infection.

Keywords: *Brucella canis*; antibody; antigen; evolution.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los perros pueden ser afectados por cuatro de las seis especies de *Brucella* (*Brucella canis*, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) (Hollet, 2006; Pretzer, 2008). La brucelosis canina, causada por *Brucella canis*, es una enfermedad bacteriana contagiosa que se caracteriza por abortos en hembras y epididimitis, atrofia testicular e infertilidad en machos (Hollet, 2006).

Las brucelas son bacilos cocoides, pequeños, Gram negativas, sin cápsula, patógenos intracelulares facultativos. *Brucella canis* es un cocobacilo de 0,5 a 0,7 μm de diámetro por 0,5 a 1,5 μm de longitud, inmóvil, no esporulado, aerobio estricto. Crece en agar sangre y agar tripticosa soya generando colonias rugosas, no requiere suero ni CO_2 para el crecimiento, no produce H_2S , es oxidasa y ureasa positivo (Soloaga *et al.*, 2004; Ardoíno *et al.*, 2006).

La enfermedad comienza con la penetración de la bacteria a través de una membrana mucosa, ya sea oral, nasal conjuntival o genital y luego es fagocitada por los macrófagos, (Wanke, 2004). *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos debido a su capacidad de inhibir la formación del complejo fagolisosoma, con lo cual impide la actuación de las enzimas lisosomales. *Brucella canis* resiste la acción del peróxido de hidrógeno del estallido respiratorio a partir de sus enzimas superóxido dismutasa y catalasa, que le permiten eliminar los radicales libres (Borie *et al.*, 2002). A continuación se invaden los linfonodos regionales, en los que se produce hiperplasia. Finalmente se propaga vía hematógena y linfática, la bacteremia se produce entre 1 a 4 semanas post infección y puede mantenerse en forma intermitente o continua hasta 64 meses (Shin y Carmichael, 1999). Durante ese período la bacteria coloniza distintos órganos, tales como hígado, bazo, próstata y epidídimo, en los cuales provoca infiltración de células inflamatorias (Borie *et al.*, 2002).

El tratamiento de la enfermedad en general es caro, poco exitoso y se recomienda sólo en aquellos animales que puedan ser monitoreados durante y después del tratamiento (Shin y Carmichael, 1999; Ardoíno *et al.*, 2006). En muchos casos de perros afectados se opta por la eutanasia, ya sea por mala respuesta al tratamiento o por decisiones económicas. Por lo tanto una de las mejores formas de combatir esta enfermedad es la prevención y una forma de realizarla es a través de la esterilización temprana de los animales de compañía (Root, 2002; Reichler, 2008).

Los antígenos de la membrana externa de *Brucella* han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprolifaxis; esto resalta considerando que representa el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador. Las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMPs: *outer membrane proteins*) (Estein, 2006).

El lipopolisacárido liso (LPS-S) consta de una parte glicolípídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacárida expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo o *core*, más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*). El PSO es el antígeno inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta y blanco de anticuerpos protectores (Estein, 2006).

En *Brucella* han sido identificadas varias proteínas periplásmicas inmunogénicas cuyos genes han sido clonados, tales como la superóxido dismutasa (SOD) dependiente de cobre y zinc, y BP26 o CP28 y P39. Entre las proteínas citosólicas se han caracterizado las proteínas del estrés térmico: GroEL, GroES, DnaK, HtrA; las proteínas YajC, UvrA; la bacterioferritina (BFR), la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y las proteínas ribosomales: L7/L12 y cp24 (Estein, 2006).

La inmunidad en brucelosis canina está determinada por la respuesta humoral y celular, cumpliendo la inmunidad celular un rol fundamental, pero no exclusivo como ocurre con todas las bacterias que son parásitos intracelulares. De hecho, algunos antígenos bacterianos son capaces de aumentar la formación, atracción y activación de una gran cantidad de macrófagos, sin mediación de la inmunidad celular. El LPS es capaz de activar la fagocitosis y ciertas proteínas de membrana bacteriana, inducen la liberación de interleuquinas (IL) que a su vez aumentan la infiltración de fagocitos en el bazo y la producción *in situ* de nuevos fagocitos. Así pues, la intensa respuesta inflamatoria hiperplásica, la inmunidad mediada por linfocitos T (CD8 y CD4) y la acción de las inmunoglobulinas, contribuyen a la eliminación de la bacteria. Desgraciadamente, esto tan sólo ocurre en una pequeña proporción de individuos, ya que en la mayoría de los casos se instaura un cuadro crónico (Blasco y Gamazo, 1994). Los anticuerpos se hacen detectables a partir de las dos semanas post infección (Wanke, 2004).

Aunque los síntomas de la brucelosis canina son evidentes, muchos de los perros infectados no muestran signos. La infección usualmente es diagnosticada por medio de cultivo de sangre, semen, secreciones vaginales y restos de aborto. Ya que el aislamiento es lento y su sensibilidad puede ser afectada por períodos de abacteremias intermitentes, la detección de anticuerpos para antígenos de *Brucella* tiene un rol central en el diagnóstico de *B. canis* (Lucero *et al.*, 2002).

El diagnóstico serológico de brucelas rugosas es difícil, particularmente por la ausencia del polisacárido O en su lipopolisacárido, que es la base de la mayoría de las pruebas para brucelosis, y en especial por la naturaleza de los antígenos de la superficie celular, que tienden a aglutinar y a veces causan activación del complemento en ausencia de anticuerpos (Nielsen *et al.*, 2004).

Los antígenos usados en el inmunodiagnóstico de *Brucella canis* consisten en varias proteínas somáticas y componentes de superficie, pero existen similitudes antigénicas entre especies del mismo género, como *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis* o *B. abortus* (Ebani, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Daltro de Oliveira *et al.*, 2011). Se han descrito epitopos comunes entre las especies de *Brucella* y otras bacterias tales como las alfaproteobacterias del suelo y plantas, incluyendo el género *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* y *Ochrhobactrum* (Delpino, 2004; Daltro de Oliveira, 2011). La ocurrencia de falsos positivos debido a reacciones cruzadas de *Brucella* y otras bacterias patógenas en el diagnóstico serológico incluyen infección por *Salmonella*, *Yersinia enterocolítica* y *Escherichia coli* (Nielsen *et al.*, 2007; Bounaadja, 2009; Daltro de Oliveira *et al.*, 2011).

El diagnóstico de la respuesta inmune humoral de brucelosis canina incluye métodos como la aglutinación en tubo con o sin 2- Mercaptoetanol (TAT y 2ME-TAT), la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT) y 2ME-RSAT. Con estas pruebas se ha encontrado un número considerable de resultados positivos en perros no infectados. Se ha establecido que la aparición de estos falsos positivos es causada por determinantes antigénicos de superficie (LPS-R) de *B. canis* compartidos con otras especies bacterianas (Baldi *et al.*, 1994; Hollet, 2006). El uso de antígenos purificados permite mejorar especialmente la especificidad de las pruebas serológicas. Es así como en 1969 Galanos *et al.*, elaboraron un nuevo método de extracción que permitió la elaboración de antígenos LPS-R puros, limitando con esto las reacciones cruzadas (FAO/IAEA, 1993). A diferencia de los antígenos obtenidos por extracción salina caliente que contienen LPS-R como también un número de antígenos proteicos de superficie y que pueden causar reacciones cruzadas con brucelas lisas (Nielsen *et al.*, 2004).

El ELISA indirecto propuesto como diagnóstico se aconseja para estudiar los sueros positivos a RSAT, como una prueba complementaria después de ésta, aumentando la especificidad. (Daltro de Oliveira *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue determinar la evolución de la respuesta inmune humoral frente a dos estructuras antigénicas de *Brucella*: El LPS-R y antígeno citosólico de una cepa rugosa, como lo es *Brucella abortus* RB51. A través de una prueba de ELISA-I, en perras inoculadas experimentalmente con *Brucella canis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. SUEROS:

Los sueros utilizados fueron obtenidos previamente por el Laboratorio de Microbiología de FAVET, mediante inoculación experimental de dos hembras caninas adultas jóvenes no preñadas, con la cepa patógena de *B. canis* RM 666, donada por el Dr. L. E. Carmichael (Cornell University, USA) (Sotomayor, 2001).

El muestreo de sangre de las perras infectadas (A y B) se realizó una vez a la semana, hasta que se detectó por primera vez una reacción serológica positiva a la contraelectroforesis (CIEF) con antígeno proteico citosólico de *B. abortus* RB51, prueba de precipitación actualmente utilizada en FAVET para el diagnóstico de brucelosis canina. Luego, el muestreo de sangre se realizó a diferentes tiempos durante un período de 8 meses con el fin de conocer la permanencia en el tiempo de los anticuerpos mediante CIEF tanto con antígeno proteico citosólico como con LPS-R de *B. ovis* (obtenido mediante extracción salina caliente). Se estableció la infección de los animales cuando se pesquisó seropositividad a CIEF con LPS-R y/o frente a hemocultivos positivos (Sotomayor, 2001). Estos sueros se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su posterior uso (Tabla 1).

Como control positivo se utilizó un *pool* de 10 sueros de perros positivos a la prueba de CIEF, con signología asociada y como control negativo un *pool* de 10 sueros de perros negativos a CIEF y clínicamente sanos.

TABLA 1. Días de muestreo y detección de anticuerpos mediante CIEF con antígenos LPS-R de *B. ovis* y proteínas citosólicas de *B. abortus* Cepa RB51, en dos perras experimentalmente infectadas con *B. canis* (Sotomayor, 2001).

Días post inoculación (PI)	CIEF LPS-R		CIEF PROT. CITOSÓLICAS	
	A	B	A	B
6	-	-	-	-
12	-	-	-	-
18	+	+	-	-
25	+	+	-	-
32	+	S/E	-	S/E
39	+	+ (*)	-	-
46	+	+	-	-
53	+ (*)	S/E	-	S/E
59	+	+	-	+
67	+	S/E	-	S/E
81	+	+	+	+
102	+	+	+	+
123	+	+	+	+
144	+	S/E	+	S/E
165	+	+	+	-
186	+	+	+	-
206	+	+	+	-
226	+	+	+	-
246	+	+	+	-
266	+	+	+	-

S/E : Sin existencia.

(*) Hemocultivo positivo.

B. ANTÍGENOS:

- a. LPS-R de *Brucella abortus* Cepa RB51, obtenido a través del método de Galanos *et al.* (1969).
- b. Extracto citosólico de *Brucella abortus* Cepa RB51, obtenido según recomendaciones de Aragón y Moreno (1996).

C. PRUEBAS DE ELISA-I:

Se realizaron dos tipos de ELISA indirecto, uno con antígeno citosólico *B. abortus* RB51 según protocolo modificado del elaborado por Araya (1999) y con antígeno LPS-R *B. abortus* RB51 siguiendo las indicaciones de Meza (2011), ambos estudios realizados en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Chile . Para cada ELISA-I se utilizaron placas de poliestireno (Polysorp[®], NUNC, Denmark), una placa para cada tipo de antígeno, que fueron sensibilizadas con los antígenos en una dilución de 1:100 en tampón carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 +/- 0,05 e incubadas a temperatura ambiente por 18-24 h. Al día siguiente, las placas fueron bloqueadas con seroalbúmina bovina (BSA) al 2% por 18-24 h. Luego se agregaron los sueros en duplicado en una dilución de 1:100 en PBS/T 0,05%/EDTA 10 mM y se incubaron durante una hora a 37°C. Pasada una hora se agregó a cada pocillo de la placa anti IgG canina conjugado a peroxidada (A9042 Sigma[®]) en una dilución de 1:9000 en el caso de la placa con antígeno LPS-R RB51 y en una dilución de 1:12000 en la placa con antígeno citosólico (modificación del protocolo original), se llevaron a incubadora por una hora a 37°C. Luego para la reacción de colorimétrica se adicionó solución sustrato cromógeno compuesta por 1mM de ABTS (ácido 2,2'-azino bis [3-ethyl-benzthiazoline sulfónico]) y 4,4mM de H₂O₂ en tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5 +/- 0,05. Se incubaron por quince minutos. La reacción enzimática se detuvo añadiendo una solución de sodio dodecil sulfato (SDS) al 4%. La lectura de las placas se realizó en un equipo INMUNOSKAN Plus[®] (BDSL) con un filtro de 405 nm, que entrega los resultados en densidades ópticas (DO).

Interpretación de las lecturas:

Con la finalidad de facilitar la comparación de los sueros, las DO fueron transformadas en porcentajes de positividad (PP). Así, el control positivo de la respectiva microplaca fue tomado como base para tal efecto y se consideró que poseía un 100% de PP (FAO/IAEA, 1993).

$$PP = \frac{DO \text{ suero problema}}{DO \text{ Control (+)}} \times 100$$

DO Control (+)

Obtención de las líneas de corte o *cut-off*

Para cada ELISA-I, citosol y LPS-R, se utilizaron líneas de corte ya obtenidas en los protocolos de Araya (1999) y Meza (2011), respectivamente. En el caso del ELISA-I con antígeno citosólico se debió calcular un nuevo *cut-off*, debido a la modificación que se realizó en la dilución de su conjugado. Esta nueva dilución fue obtenida por titulación tipo *checkerboard*, determinando la dilución de conjugado más adecuada.

RESULTADOS

A. ELISA-I CON ANTÍGENO LPS-R *B. abortus* Cepa RB51.

A1. Evolución de los porcentajes de positividad (PP).

En la Tabla 2 se aprecian los PP obtenidos para el ELISA-I LPS-R para las dos perras, A y B, en cada uno de los muestreos sucesivos.

En el Gráfico 1 se pueden apreciar los PP según los días post infección para ambas perras, A y B. Se evidencia la evolución de los porcentajes de positividad a partir del día 6 PI. Luego del día 25 PI se observa un nivel constante de anticuerpos en ambas perras.

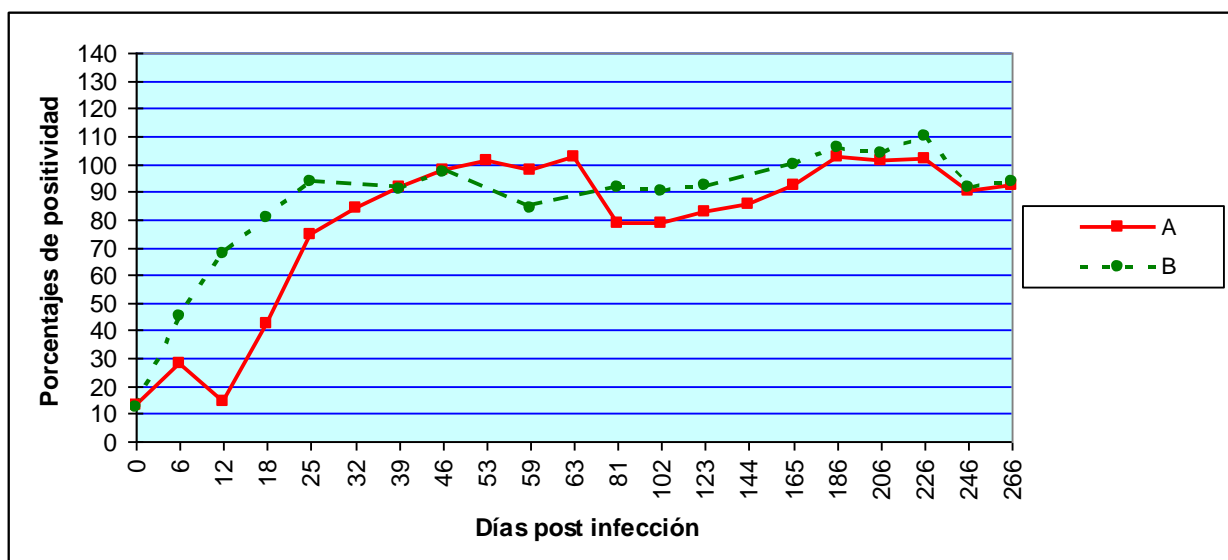


Gráfico 1. Porcentajes de positividad según días post infección de ELISA-I con antígeno LPS-R *B. abortus* RB51.

A2. Determinación de positividad/negatividad en la evolución de anticuerpos.

La línea de corte +/- o *cut-off* utilizado en este ELISA-I LPS-R fue calculada por Meza (2011), mediante la metodología *Receiver- Operator Characteristic* (ROC). El valor de *cut-off* fue de 65%, implicando que todo suero que tuviera un PP superior o igual a 65% fue considerado como positivo y un PP inferior a éste fue tomado como negativo.

En el Gráfico 2 se representan los resultados para este *cut-off*. Ya se observa positividad al día 25 PI en el caso de la perra A y al día 12 PI en la perra B, con positividad hasta el final del estudio.

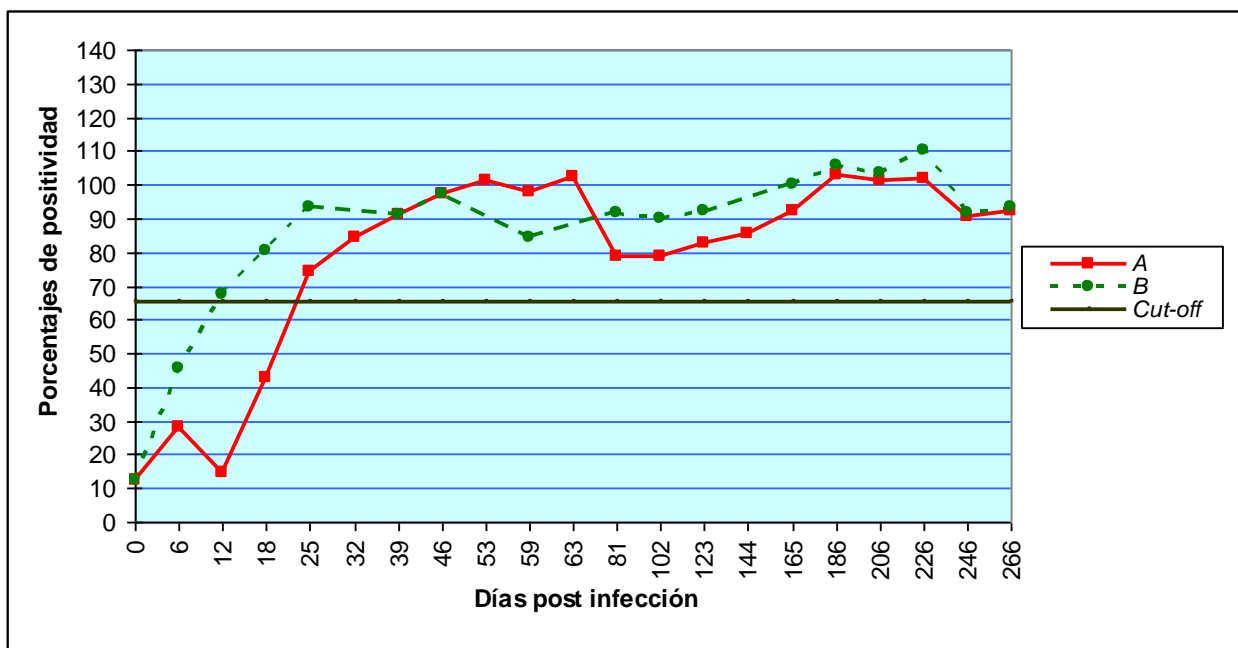


Gráfico 2. Porcentajes de positividad de ELISA-I con antígeno LPS-R *B. abortus* RB51 y *cut-off*.

B. ELISA-I CON ANTÍGENO CITISÓLICO *B. abortus* Cepa RB51.

B1. Evolución de los porcentajes de positividad (PP).

Los resultados de PP obtenidos con el ELISA-I citosólico en ambas perras se muestran en la Tabla 3.

La evolución de los PP de ambas perras, A y B, según días post infección se muestran en el Gráfico 3. Se observa presencia de anticuerpos desde el día 6 PI, los que se mantienen estables en ambas perras, aunque en menor nivel en el caso de A.

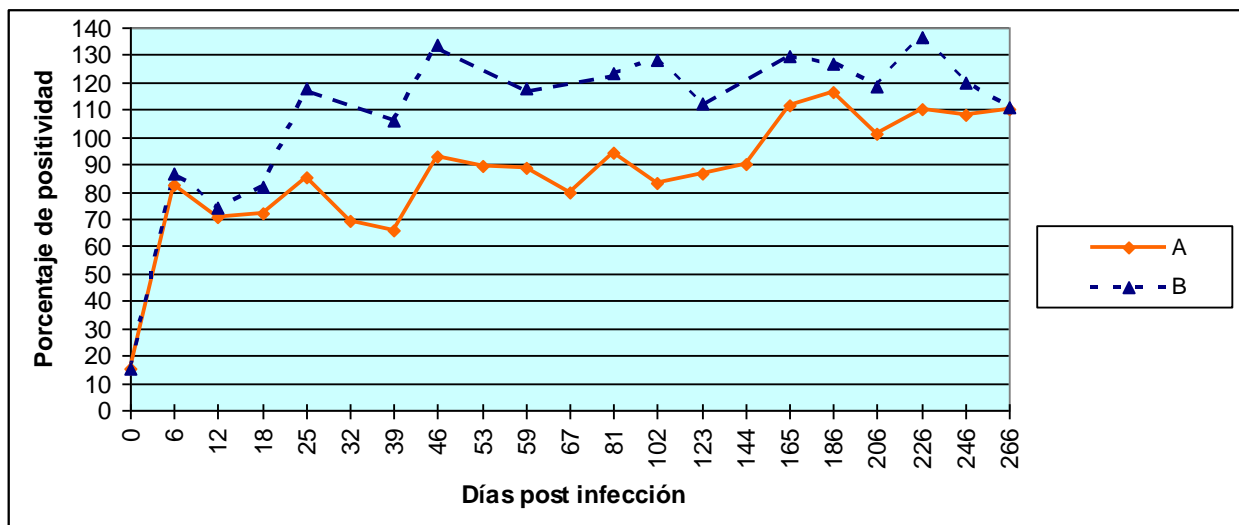


Gráfico 3. Porcentajes de positividad según días post infección de ELISA-I con antígeno citosólico *B. abortus* RB51.

B2. Determinación de positividad/negatividad en la evolución de anticuerpos.

El *cut-off* para este ELISA-I fue calculado mediante método ROC, utilizando el programa MedCalc para Windows versión 11.6.1, en base sueros positivos o negativos a CIEF. La línea de corte entregada por el programa fue de un 97%, con una sensibilidad de 84,21% y una especificidad de 92,21%. Con esta línea de corte tenemos el punto de PP en el cual la suma del valor de sensibilidad y especificidad da el máximo valor, por lo tanto, el menor porcentaje de error total. Los PP con un valor por bajo este *cut-off* fueron tomados como negativos y con un PP mayor o igual fueron considerados positivos (Gráfico 4).

En el gráfico se observa que los anticuerpos producidos por A son estables desde el día 6 PI, pero no logran sobrepasar la línea de corte, considerándose negativa hasta el día 165 PI, día en que aumenta su PP y es tomada como positiva. Para B tenemos que ya al día 25 PI presenta un PP por sobre la línea de acorte. Ambas con permanencia de positividad hasta el final del estudio.

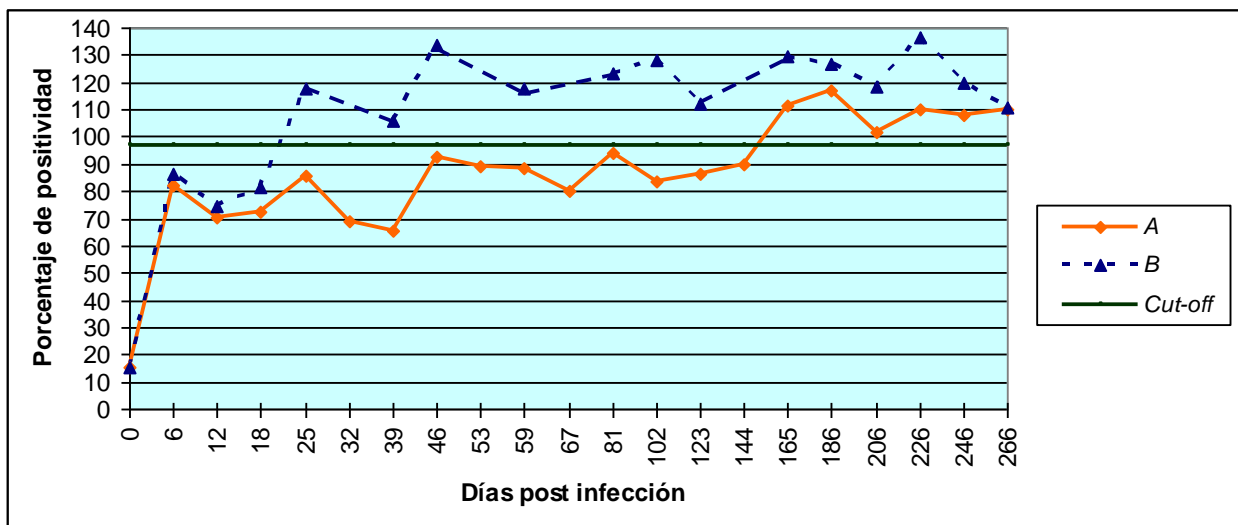


Gráfico 3. Porcentajes de positividad de ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 y *cut-off*.

DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento de *Brucella canis*, han sido desarrolladas varias pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección. La diversidad de pruebas y la falta de un protocolo en común llevan a dificultades en la interpretación de los resultados serológicos (Mateu-de-Antonio *et al.*, 1994). Es por esto que cada vez más se busca generar protocolos estandarizados de las pruebas serológicas, y en mayor medida, en cuanto a qué antígenos utilizar. En general, los métodos para detectar brucelosis canina incluyen pruebas de aglutinación y precipitación que se basan en la detección de anticuerpos contra antígenos de la membrana externa. El considerable índice de reacciones falsas positivas, observadas con estas pruebas, ha llevado a algunos autores a proponer el uso de antígenos citosólicos para aumentar su especificidad, por ser altamente específicos y conservados dentro del género *Brucella*. Es así que Wanke *et al.*, (2002) llevaron a cabo un estudio en el cual compararon el uso de estos dos tipos de antígenos, a través de una prueba de ELISA, dando como resultado que la especificidad de los anticuerpos contra antígenos de membrana fue menor a la de anticuerpos contra proteínas citosólicas (CP) (94,3 y 96,7%, respectivamente). La sensibilidad fue de un 97% para antígenos de membrana y de un 94% para CP.

Este estudio buscó poder presentar en forma descriptiva y gráfica la evolución de anticuerpos mediante la realización de dos ELISA-I, con antígeno citosólico y LPS-R, ambos obtenidos de *B. abortus* Cepa RB51, determinando el momento de aparición de anticuerpos y su permanencia en el tiempo. Se siguieron los mismos pasos para cada uno, según lo indicado en estudios previos, salvo al agregar el conjugado antiinmunoglobulina, que en el caso del ELISA-I con citosol fue de 1:12000 y para el ELISA-I con LPS-R se agregó en una dilución de 1:9000 (Araya, 1999; Meza, 2011).

En la prueba de CIEF realizada a los sueros utilizados en este estudio, con un antígeno de extracción salina –caliente de *B. ovis*, rico en LPS-R pero con proteínas de membrana, ambas perras presentaron positividad al día 18 PI, con una permanencia de anticuerpos durante todo el estudio. En la CIEF con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51 se logró observar positividad al día 81 PI en la perra A y al día 59 PI en el caso de B. Observándose persistencia de anticuerpos sólo en una de las perras, en A, en B se aprecia positividad hasta el día 123 PI (Sotomayor, 2001).

En el ELISA-I realizado con antígeno LPS-R RB51, al día 25 PI se pudo ver positividad en una de las perras (A) y al día 12 PI en la segunda perra (B). Los anticuerpos también se detectaron durante todo el resto del estudio. Para el caso de la perra A, hubo una aparición más tardía de anticuerpos en comparación a la CIEF LPS-R y aparición más temprana para la perra B. Considerando el caso de B, la detección temprana de anticuerpos nos sugiere una sensibilidad analítica mayor del ELISA-I LPS-R respecto a CIEF, permitiendo detectar cantidades menores de anticuerpos de manera cuantitativa. Por lo tanto, ser CIEF una prueba cualitativa es probable que se puedan tener resultados falsos negativos o falsos positivos en etapas tempranas de la enfermedad, ya que los sueros que dan líneas de precipitación tenues como resultado son interpretados según el criterio del personal de laboratorio.

Con el ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51, aparece seropositividad al día 165 PI en el caso de la perra A y al día 25 PI para la perra B. Se pudo constatar la permanencia de anticuerpos hasta el final del estudio en ambas perras. En CIEF citosol, la perra B muestra seronegatividad a los 165 días PI, esto último pudo ser debido a que la cantidad de anticuerpos detectables por la prueba de CIEF con antígeno citosólico se hizo menor a la detectable por dicha prueba. De esto se puede desprender que el ELISA-I realizado presentó una mayor sensibilidad en cuanto a CIEF, siendo capaz de detectar cantidades inferiores de anticuerpos, corroborando el uso de antígeno citosólico para el diagnóstico de casos crónicos de la enfermedad (Carmichael *et al.*, 1984).

En cuanto a la diferencia en el momento de aparición de anticuerpos del ELISA-I citosol, día 165 PI en el caso de la perra A y día 25 PI para la perra B, cabe mencionar que en la prueba de CIEF con antígeno citosólico también se pudo ver una respuesta más tardía de A, con una aparición de anticuerpos al día 81 PI. Podemos suponer que la menor respuesta a este antígeno en la perra A se debería a una variación individual, dada por una respuesta inmune más deficiente. Esta deficiencia se puede explicar por una falla en la presentación de antígenos citosólicos por parte de las células dendríticas o por una respuesta inmune dada principalmente por linfocitos Th₂ existiendo, por ende, una mayor liberación de interleuquinas IL4, IL10 y IL13 que inhiben la activación de los macrófagos, llevando a una menor producción de anticuerpos (Tizard, 1998). El conjugado antiinmunoglobulina en el ELISA-I citosol fue utilizado en una dilución 1:12000, dilución mayor a la utilizada en el ELISA-I con antígeno LPS-R (1:9000), lo que puede haber afectado la formación de complejo antígeno-anticuerpo-antiinmunoglobulina y llevado también a una detección más tardía de anticuerpos.

Se han reportado varios estudios dirigidos a obtener y aplicar antígenos inmunodominantes en el diagnóstico de brucelosis canina basado en la técnica de ELISA con resultados variables en términos de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Wanke, 2004). Las diferentes técnicas para extraer los antígenos de *B. canis* puede interferir con la composición proteica o alterar la estructura primaria de los epitopos, causando problemas al momento de utilizarlos para diagnóstico. De hecho, algunos autores han demostrado que antígenos citosólicos pueden proveer más sensibilidad y especificidad que las pruebas con preparaciones antigénicas de membrana externa de *B. canis* (Carmichael *et al.* 1984, Daltro de Oliveira *et al.*, 2011). Nielsen *et al.*, (2004) citan el uso de un ELISA indirecto utilizando como antígeno LPS-R obtenido de un cultivo de *B. canis*, lográndose en este caso una especificidad del 98,9% y sensibilidad del 95,8%. En este mismo estudio, con LPS-R de *B. abortus* se logró una especificidad de 100% y una sensibilidad de 95,8%.

Como es el caso de todas las pruebas de ELISA, la eficiencia diagnóstica depende del antígeno y del sistema de detección utilizado. Es así que el antígeno obtenido por extracción salina caliente, utilizado en CIEF, contiene un número de proteínas de superficie como también LPS-R. La presencia de proteínas de superficie puede causar reacciones cruzadas con *Brucellas* lisas y posiblemente con otras bacterias, mientras que el LPS-R parece reaccionar menos (Nielsen *et al.* 2004). El LPS-R utilizado en este estudio fue obtenido mediante el método de Galanos *et al.* (1969), que asegura la extracción de un lipopolisacárido puro, sin contaminación de proteínas de superficie, otorgando una mayor especificidad a la prueba de ELISA-I, en comparación a CIEF tradicional que utiliza LPS-R de *B. ovis* derivado de la extracción salina caliente.

Como método serológico diagnóstico, ELISA tiene ventajas importantes sobre otras pruebas serológicas comúnmente usadas, tales como proveer resultados fácilmente cuantificables, ser fácil de realizar y estandarizar (Daltro de Oliveira *et al.*, 2011). Dando importancia a que su desarrollo y finalmente sus resultados dependen del método de obtención de los antígenos, de la diluciones empleadas al momento de trabajar y que siguiendo un protocolo estandarizado, se pueden obtener resultados fidedignos y certeros para el diagnóstico de la enfermedad. Se debe considerar también que el uso de antígeno citosólico mejora la especificidad de esta prueba, disminuyendo la cantidad de resultados falsos positivos.

En conclusión, ambos ELISA-I fueron capaces de detectar anticuerpos tempranamente y fue posible constatar su permanencia en el tiempo. La detección de anticuerpos se mantuvo detectable, al menos, hasta la semana 38 PI con ambos ELISA-I. Tanto el ELISA-I con antígeno citosólico como con LPS-R de *B. abortus* Cepa RB51 puede ser utilizado para el diagnóstico de brucelosis canina.

BIBLIOGRAFÍA

Aragón V, Moreno E. 1996. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O- type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 178:1070-1079.

Araya A. 1999. Memoria de Título. Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnóstico serológico de brucelosis canina. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

Ardoíno SR, Baruta DA, Toso RE. 2006. Brucelosis canina. *Ciencia Veterinaria* 8:49-60.

Baldi PC, Fossati CA, Loza ME, Wanke MM. 1994. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 41:127-134.

Blasco J, Gamazo C. 1994. Brucelosis animal. *Investigación y Ciencia* 218:56-62.

Borie C, Cepeda R, De Los Reyes M, Villarroel M. 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 34: 111-116.

Bounaadja L, Albert D, Chénais B, Hénault S, Zygmunt MS, Poliak S, et al. 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. *Veterinary Microbiology* 137:156-164.

Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. 1984. Problems en the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Developments in Biological Standardization* 56:371-383.

Daltro de Oliveira MZ, Barrouin-Melo SM, Menezes S, Meyer R, Portela R, Vale V, et al. 2011. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Research in Veterinary Science* 90:425-431.

Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. 2004. Occurrence and potential diagnostic applications of serological cross-reactivities between *Brucella* and other alphaproteobacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11:868-873.

Ebani VV, Bey RF, Cerri D, Fratani F, Andreani E. 2003. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiology* 26:65-73.

Estein S. 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. [Internet]. Disponible en <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html>>. [Citado en Oct 2010].

FAO/IAEA. 1993. Brucellosis ELISA kit manual. Joint FAO/IAEA Division. Agriculture Laboratory. Animal Production and Health unit. Seibersdorf, Austria.

Galanos C, Lüderitz O, Estpahl O. 1969. A new method for the extraction of R-lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry* 9:245-249.

- Hollet RB.** 2006. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 66:575-587.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G.** 2002. Sensitivity and especificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *Journal of Medical Microbiology* 51:656-660.
- Mateu-de-Antonio EM, Martin M, Casal J.** 1994. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6:257-259.
- Meza MI.** 2011. Memoria de Título. Desarrollo de un ELISA indirecto utilizando antígeno LPS-R de *Brucella abortus* cepa RB51, para el diagnóstico serológico de brucelosis canina. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
- Nielsen K, Conde S, Draghi de Benitez G, Gall D, Halbert G, Jolley M, et al.** 2004. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 25:171-182.
- Nielsen K, Smith P, Yu WL, Halbert G.** 2007. *Salmonella enterica* serotype urbana interference with brucellosis serology. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 28:289-296.
- Pretzer S.** 2008. Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen. *Theriogenology* 70:320-326.
- Reichler, I.** 2008. Surgical Contraception: Pros and Cons. Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress. Vienna, Austria.
- Root, M.** 2002. Early Spay-Neuter: Clinical Considerations. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 17:124-128.
- Shin SJ, Carmichael L.** 1999. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. [Internet]. Disponible en <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/shin/ivis.pdf> [Citado en Ago 2010].
- Soloaga R, Salinas A, Potallo M, Margari A, Suar B, Lucero NE, et al.** 2004. Bacteriemia por *Brucella canis*: Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Revista Argentina de Microbiología* 36:81-84.
- Sotomayor M.** 2001. Memoria de Título. Diagnóstico de brucelosis canina: utilización de un antígeno proteico citosólico de *Brucella abortus* cepa RB51 en perros infectados experimentalmente. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
- Tizard I.** 1998. *Inmunología Veterinaria: Transformación de antígenos*. Quinta edición. Mc Graw-Hill.
- Wanke MM.** 2004. Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science* 82-83:195-207.
- Wanke MM, Delpino MV, Baldi PC.** 2002. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 88:367-375.

TABLA 2. Resultados de ELISA-I con antígeno LPS-R *B. abortus* RB51.

PERRA	SUERO	PI	DO		PROMEDIO	PP
A	1	6	0,247	0,298	0,273	28
	2	12	0,015	0,266	0,141	14
	3	18	0,445	0,383	0,414	42
	4	25	0,729	0,719	0,724	74
	5	32	0,788	0,855	0,822	84
	6	39	0,855	0,925	0,890	91
	7	46	0,947	0,953	0,950	97
	8	53	0,980	0,993	0,987	101
	9	59	0,945	0,958	0,952	98
	10	67	0,973	1,018	0,996	102
	11	81	0,761	0,770	0,766	79
	12	102	0,775	0,761	0,768	79
	13	123	0,827	0,788	0,808	83
	14	144	0,814	0,857	0,836	86
	15	165	0,925	0,874	0,900	92
	16	186	1,007	0,995	1,001	103
	17	206	1,004	0,968	0,986	101
	18	226	0,998	0,990	0,994	102
	19	246	0,876	0,885	0,881	90
	20	266	0,916	0,877	0,897	92
B	21	6	0,447	0,436	0,442	45
	22	12	0,698	0,619	0,659	68
	23	18	0,783	0,782	0,783	80
	24	25	0,919	0,904	0,912	93
	25	39	0,910	0,866	0,888	91
	26	46	0,903	0,992	0,948	97
	27	59	0,814	0,828	0,821	84
	28	81	0,879	0,912	0,896	92
	29	102	0,841	0,912	0,877	90
	30	123	0,895	0,901	0,898	92
	31	165	0,965	0,984	0,975	100
	32	186	1,042	1,022	1,032	106
	33	206	1,032	0,989	1,011	104
	34	226	1,104	1,042	1,073	110
	35	246	0,917	0,872	0,895	92
	36	266	0,883	0,942	0,913	94

TABLA Nº 3. Resultados ELISA-I con antígeno citosólico de *B. abortus* RB51.

PERRA	SUERO	PI	DO		PROMEDIO	PP
A	1	6	0,599	0,564	0,582	82
	2	12	0,544	0,454	0,499	71
	3	18	0,517	0,507	0,512	72
	4	25	0,595	0,615	0,605	86
	5	32	0,480	0,499	0,490	69
	6	39	0,549	0,382	0,466	66
	7	46	0,648	0,664	0,656	93
	8	53	0,581	0,684	0,633	89
	9	59	0,534	0,721	0,628	89
	10	67	0,651	0,479	0,565	80
	11	81	0,656	0,679	0,668	94
	12	102	0,598	0,582	0,590	83
	13	123	0,610	0,612	0,611	86
	14	144	0,648	0,625	0,637	90
	15	165	0,792	0,787	0,790	112
	16	186	0,842	0,809	0,826	117
	17	206	0,773	0,662	0,718	101
	18	226	0,804	0,757	0,781	110
	19	246	0,734	0,794	0,764	108
	20	266	0,785	0,770	0,778	110
B	21	6	0,611	0,612	0,612	86
	22	12	0,529	0,521	0,525	74
	23	18	0,486	0,671	0,579	82
	24	25	0,838	0,832	0,835	118
	25	39	0,736	0,761	0,749	106
	26	46	0,953	0,936	0,945	133
	27	59	0,845	0,821	0,833	118
	28	81	0,878	0,863	0,871	123
	29	102	0,919	0,895	0,907	128
	30	123	0,882	0,709	0,796	112
	31	165	0,917	0,919	0,918	130
	32	186	0,856	0,941	0,899	127
	33	206	0,925	0,750	0,838	118
	34	226	0,961	0,970	0,966	136
	35	246	0,852	0,848	0,850	120
	36	266	0,777	0,789	0,783	111