



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



DESARROLLO DE UN ELISA INDIRECTO CON  
ANTÍGENO LPS-R DE *Brucella abortus* Cepa RB51, PARA EL  
DIAGNÓSTICO  
SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS CANINA

**MARÍA IGNACIA MEZA CERDA**

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ABALOS PINEDA

SANTIAGO, CHILE

2011



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



DESARROLLO DE UN ELISA INDIRECTO CON  
ANTÍGENO LPS-R DE *Brucella abortus* Cepa RB51, PARA EL  
DIAGNÓSTICO  
SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS CANINA

**MARÍA IGNACIA MEZA CERDA**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO ABALOS P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: ALICIA VALDÉS O.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2011

## AGRADECIMIENTOS

A todos quienes estuvieron presentes en el difícil proceso universitario, brindando el inmenso apoyo, cariño y comprensión. Sin duda que cada uno de ustedes ha contribuido con uno o más granitos de arena haciendo de mi camino una vida llena de bonitos recuerdos, grandes experiencias y aprendizajes, que de seguro continuarán habiendo.

Mis sinceros agradecimientos a:

- A mi familia por su incondicional apoyo y amor durante toda mi vida y a Margarita, mi segunda Mamá.
- A Tito, quien nunca dudó en mis capacidades de sacar adelante la carrera. Eres un pilar emocional fundamental en mi vida y doy fe de que será así *“siempre siempre”*.
- A todos mis amigos que se han sumado a mi camino a lo largo de este aún corto recorrido. Largas horas de estudio, cansancio y malos ratos, pero por sobre todo alegrías, risas por montones e increíbles recuerdos. Ale, Luni, Sasito, Jochita, Paulita, Isha, Ani, con quienes desde el primer día de clases hemos mantenido una preciosa amistad.
- Al Dr. Pedro Abalos por confiar en mí, darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y brindarme todo el apoyo necesario para terminar esta memoria, así como también al Dr. Patricio Retamal.
- A la Dra. Consuelo Borie por su maternal paciencia y fundamental cooperación en el desarrollo de la Memoria.
- Al Dr. Carlos Robles Inta- Bariloche, Argentina. Por su directa colaboración en esta Memoria.
- A la Dra. Marlen Barreto por su directa colaboración en esta Memoria.
- A mis compañeros de laboratorio, en especial Daniela Ruz.
- Además agradecer a los auxiliares del departamento y a Patricia, la secretaria, quienes también fueron importantes en el desarrollo de mi tesis.

MEMORIA DE TÍTULO

**“DESARROLLO DE UN ELISA INDIRECTO CON ANTÍGENO LPS-R DE *Brucella abortus* Cepa RB51, PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS CANINA”.**

**“DEVELOPMENT OF AN INDIRECT ELISA USING ANTIGEN OF LPS-R from *Brucella abortus* strain RB51, for serological diagnosis of canine brucellosis”**

**María Ignacia Meza Cerda \***

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

## RESUMEN

El diagnóstico definitivo y específico de la brucelosis en caninos, causada por *Brucella canis* (*B. canis*), se realiza mediante el aislamiento de la bacteria desde muestras patológicas o fluidos. Sin embargo, como la enfermedad se caracteriza por presentar periodos abacterémicos, un cultivo negativo no excluye la posibilidad de infección. Debido a que se utiliza ampliamente la detección de anticuerpos frente a la infección y que tanto *B. ovis* y *B. canis* comparten componentes antigénicos con la cepa vacuna *Brucella abortus* RB51 (*B. abortus* CRB51), ésta podría ser usada como antígeno en el diagnóstico serológico de la enfermedad. En el presente estudio, se describe un enzoinmunoensayo indirecto (ELISA-I) para el serodiagnóstico de brucelosis canina utilizando un extracto altamente purificado de lipopolisacárido rugoso (LPS-R) de *Brucella abortus* CRB51, cuyos resultados fueron comparados con la técnica contrainmunolectroforesis (CIEF) que utiliza un antígeno extraído de una cepa rugosa de *B. ovis*, con diferentes componentes, incluyendo al LPS-R. En este estudio se incluyeron 156 sueros de perro, muestras para diagnóstico de brucelosis canina mediante CIEF, que fueron recibidas en el laboratorio de Microbiología de FAVET. El análisis de los resultados indicó asociación estadística entre ambas pruebas ( $p > 0,05$ ) para el diagnóstico de brucelosis canina. Además, ambas pruebas obtuvieron un alto índice de concordancia ( $K = 0,961$ ). Estos resultados hacen del ELISA-I propuesto una prueba promisoriosa al utilizar un antígeno más purificado y entregar resultados cuantitativos.

**Palabras claves:** *Brucella canis*, *B. abortus* CRB51, ELISA-I, contrainmunolectroforesis.

## ABSTRACT

Definitive and specific diagnosis of canine brucellosis caused by *Brucella canis* (*B. canis*) is performed by isolating the bacteria from pathologic samples or fluids. However, as the disease is characterized by the presence of abacteremic periods, a negative culture does not exclude the possibility of infection. Because the detection of antibodies to infection is widely used and that both *B. ovis* and *B. canis* share antigenic components with the vaccine strain RB51 of *Brucella abortus* (*B. abortus* SRB51), this strain could be used as an antigen in the serological diagnosis of the disease. In this study, we describe an indirect enzyme immunoassay (I-ELISA) for the serodiagnosis of canine brucellosis using a highly purified rough lipopolysaccharide (R-LPS) from *B. abortus* SRB51 and

compare the I-ELISA results with the counterimmunoelectrophoresis (CIE) technique that uses an antigen extracted from a rough strain of *B. ovis*, with different components, including the LPS-R. This study included 156 dog sera, which routinely arrived to the service of Microbiology FAVET for the diagnosis of canine brucellosis by CIEF. The analysis of the results indicated a statistical association between the two tests ( $p > 0.05$ ) for the diagnosis of canine brucellosis. In addition, both tests had a high rate of concordance ( $K = 0.961$ ). This makes the proposed I-ELISA a promising test that uses a more purified antigen and delivers quantitative results.

**Key words:** *Brucella canis*, *B. abortus* SRB51, I-ELISA, counterimmunoelectrophoresis.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial y de carácter zoonótico (10, 30, 31). Es producida por bacterias del género *Brucella* y puede infectar a varias especies animales, entre las que se encuentran porcinos, bovinos, caprinos, ovinos y caninos; además de especies silvestres tanto terrestres como acuáticas (9, 19, 25). En la mayoría de ellas se caracteriza por incidir sobre los aspectos reproductivos de los animales causando epididimitis y orquitis en machos; endometritis, placentitis y abortos en las hembras, y usualmente se presenta con infertilidad en ambos sexos (10, 31, 33).

*Brucella canis*, la especie responsable de la enfermedad en el perro, es un coccobacilo Gram-negativo que se diferencia de las otras especies de *Brucella* (excepto *B. ovis*) ya que forma colonias rugosas (6, 17, 33). Su crecimiento, requiere de entre dos a tres días para detectar sus colonias. Posteriormente, las colonias translúcidas se transforman en colonias mucosas, llegando a medir aproximadamente 1 – 1,5 mm de diámetro (6, 33).

*B. canis* presenta antigenicidad cruzada con otras brucelas rugosas tales como *B. ovis*, *B. abortus* 45/20, *B. abortus* CRB51, así como también con otras especies de bacterias como: cepas mucoides de *Pseudomonas* sp., *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus epidermidis* y *Actinobacillus equuli*. La estrecha similitud antigénica entre *B. canis* y *B. ovis* se ha utilizado como una ventaja en pruebas serológicas para *B. canis* (8).

Uno de los principales inconvenientes de esta enfermedad, se relaciona con su diagnóstico. Se han utilizado varios métodos para el diagnóstico serológico de la brucelosis canina pero ninguno es ideal (6, 33).

Las pruebas serológicas son los métodos más corrientes para evaluar el estado de los perros previo a una cruce o siempre que se sospeche de brucelosis. Estas pruebas, se basan en la detección de anticuerpos frente a componentes de la pared celular o frente a antígenos proteicos citoplasmáticos (17, 33). Sin embargo, los cultivos sanguíneos son esenciales para el diagnóstico definitivo en aquellos casos en que los resultados

serológicos son ambiguos (5, 6, 20, 23).

El diagnóstico de las cepas rugosas *B. ovis*, *B. canis* y la cepa vacuna *B. abortus* RB51, se ha logrado utilizando extracto LPS obtenido a partir de cepas rugosas, tanto en pruebas ELISA, como en ensayos de Polimerización de Fluorescencia (FPA) (10, 27).

*B. abortus* CRB51, una cepa rugosa, es resistente a rifampicina y ha derivado de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308. Esta cepa es utilizada desde 1996, en forma de vacuna, contra la brucelosis bovina en Estados Unidos y en otros países, como Chile. La cepa RB51 tiene mínima expresión de la cadena O del lipopolisacárido, componente inmunodominante en cepas lisas de *Brucella spp*, por esto, no induciría una respuesta de anticuerpos detectables contra el lipopolisacárido liso (LPS-S) a pruebas serológicas y la convierte en una cepa más segura para el vacunador y/o manipulador (29, 30).

Como *B. canis* comparte componentes antigénicos con *B. ovis* y *B. abortus* CRB51, estas cepas podrían ser usadas indistintamente como antígenos (12). En el trabajo expuesto por Escobar *et al.* (2010), se concluyó que la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT) es muy sensible como prueba tamiz y los ELISA-I que utilizan antígenos de *B. canis*, *B. ovis* y *B. abortus* CRB51 podrían ser usados indistintamente como confirmatorios ya que han demostrado alta sensibilidad y especificidad.

Nielsen *et al.* (2004), demostraron que el lipopolisacárido rugoso de *B. abortus* CRB51 puede ser utilizado como antígeno para la detección de anticuerpos contra *B. ovis*, *B. canis* y *B. abortus* CRB51 por medio de la técnica ELISA-I. Esta técnica resultó en una sensibilidad y especificidad de un 95,8% y 100%, respectivamente al analizar sueros de perro.

En términos de sensibilidad analítica, las pruebas ELISA, han demostrado ser superiores a otras técnicas serológicas, como por ejemplo a las de aglutinación, para el diagnóstico de brucelosis canina (34). Lo anterior se confirma con los estudios publicados por Lucero *et al.* (2002) y Mateau-de-Antonio *et al.* (1993). Además, los resultados presentados en el trabajo de De Oliveira *et al.* (2010), demuestran una alta sensibilidad obtenida con la técnica ELISA-I para el diagnóstico de brucelosis canina y ofrecen

resultados inmediatos, cuantitativos, fáciles de realizar y estandarizar.

El diagnóstico mediante pruebas ELISA-I y otras técnicas serológicas, ha implicado el uso de antígenos de brucelas rugosas de diferente composición incluyendo LPS, proteínas de membrana y proteínas citoplasmáticas (22, 23, 26, 34).

Debido a la importancia de llegar a un diagnóstico certero de la enfermedad, es relevante desarrollar un método diagnóstico, que permita disminuir las recomendaciones de eutanasia de aquellos ejemplares detectados como positivos a brucelosis canina, además de las pérdidas económicas que conlleva el tratamiento y la eliminación de ejemplares en los criaderos. Por último, disminuir los costos afectivos producto de la pérdida de un animal de compañía dentro de una familia. Este trabajo describe un ELISA-I para el diagnóstico de brucelosis canina causada por *B. canis* utilizando sueros de animales sanos e infectados, previamente analizados con la técnica de CIEF. El uso de un antígeno LPS-R altamente purificado (15), puede representar una mayor eficiencia en el desarrollo de la prueba ELISA-I con las características propuestas.

## MATERIALES Y MÉTODO

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET).

### ➤ Cultivo bacteriano y preparación del antígeno

#### I. Cultivo de *B. abortus* CRB51 en medio líquido.

– El método de cultivo está adaptado del utilizado en el laboratorio del Profesor Ignacio Moriyón, Universidad de Navarra, España<sup>1</sup>. La cepa de *B. abortus* RB51 se obtuvo del laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Chile, almacenada bajo el sistema Microbank™. En breve, la cepa RB51 de *B. abortus* se cultivó en 500 ml de caldo tripticasa soya estéril en cinco matraces de dos litros a 37°C durante 48 horas y en agitación constante (90 r.p.m.). Se comprobó la pureza del cultivo mediante una tinción Gram de cada matraz.

– Para la cosecha de los matraces, el cultivo se distribuyó en frascos de centrifuga de 200 mL cada uno. Éstos fueron centrifugados a 2000 x g a 4°C por 30 minutos, con el fin de eliminar el medio de cultivo o sobrenadante y los residuos bacteriales fueron resuspendidos en agua destilada estéril (15) y centrifugados nuevamente. Este procedimiento se repitió tres veces con el fin de eliminar el medio de cultivo y lavar completamente las bacterias.

– Posteriormente, se adicionó 2,5 mL de acetona por gramo de cultivo húmedo, con el fin de secar el “*pellet*” bacteriano. La suspensión de bacterias en acetona fue almacenada en estufa a 37°C hasta llegar a peso constante, debido a la evaporación completa del solvente.

#### II. Extracción de LPS-R.

– Para la extracción del LPS-R a partir de células de *B. abortus* CRB51 previamente cultivadas, se utilizó el método de Galanos *et al.* (1969), con una modificación sugerida

---

<sup>1</sup> Comunicación personal Dr. Pedro Abalos.

por el Dr. Klaus Nielsen (Agriculture and Agri-Food, Canada)<sup>2</sup> que correspondió a una sonicación entre cada etapa de extracción. Brevemente, las bacterias secas fueron sometidas a un método de extracción química con una mezcla de éter de petróleo, cloroformo y fenol en proporciones de 8:5:3 respectivamente (256, 160, 64 mL). La mezcla se dividió en tres partes iguales de 160 mL. Un tercio se mezcló con tres gramos de células secas en un matraz redondo de un litro y se homogeneizó por cinco minutos utilizando la inmersión del matraz en un sonicador para dispersar las células secas.

- La suspensión se centrifugó a 2000 x g por una hora, a 4°C. Se recuperó y reservó el sobrenadante. El residuo bacteriano recuperado se mezcló con el segundo tercio de 160 mL de la mezcla de extracción y se volvió a someter al mismo proceso y el sobrenadante recuperado se unió al primero obtenido. Esto se realizó una tercera vez.

- Luego, el éter de petróleo y el cloroformo se removieron por evaporación en estufa a 37°C, durante una semana aproximadamente, hasta volumen constante del fenol residual. En este punto se agregó agua destilada al fenol para precipitar el LPS-R. Para eliminar el fenol, se sometió a diálisis la suspensión de LPS-R-Fenol contra agua destilada por tres días a 4°C. Al eliminarse el fenol, se obtuvo un precipitado de LPS-R y este contenido fue liofilizado en el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Finalmente, se obtuvieron 117 mg de antígeno.

➤ Realización de un ELISA indirecto

I. Sueros

- En este estudio se incluyeron 156 sueros de perro, que correspondieron a las muestras que llegan rutinariamente al servicio de Microbiología de FAVET para su diagnóstico de brucelosis canina mediante CIEF. En breve, las muestras sanguíneas fueron colectadas sin anticoagulante por medio de venopunción cefálica o yugular. El suero fue separado y una porción fue sometido a la prueba de CIEF y la otra conservada a -20°C hasta su utilización. De los sueros, 81 correspondieron a perros positivos a la

---

<sup>2</sup> Comunicación personal Dr. Klaus Nielsen.

prueba de CIEF y que presentaron signología clínica asociada a la enfermedad. Los 75 sueros restantes correspondieron a sueros negativos a la prueba de CIEF. Como control positivo (+) se constituyó un “pool” de 10 sueros obtenidos a partir del grupo de los 81 seropositivos y como control negativo (-) se constituyó un “pool” de 10 sueros obtenidos a partir del grupo de los 75 seronegativos.

## II. Protocolo de ELISA-I

- Para la adhesión del antígeno a la placa de poliestireno se siguieron las recomendaciones de otros autores (1, 28). Se probaron tres tipos de placas, NUNC Polysorp, NUNC Maxisorp y DYNATECH Inmulon II. Las diluciones de trabajo del conjugado, la concentración óptima de antígeno LPS-R y la dilución de los sueros fueron determinadas previamente mediante titulaciones del tipo “checkerboard” o tablero de ajedrez. Se seleccionó la alternativa que obtuvo una razón de absorción (RA) mayor a seis y que optimizó el uso de reactivos. La RA se obtuvo del cociente entre las absorbancias (DO) del pool (+) y pool (-).

- Esta alternativa implicó que para la etapa de sensibilización, el antígeno fue utilizado en concentración de 1:100, diluido en tampón carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 +/- 0,05. Fue distribuido pasivamente en placas NUNC Polysorp, 100µL por pocillo, e incubadas a temperatura ambiente (TA) por 18 horas. Posterior al proceso de sensibilización de las placas al antígeno, éstas fueron bloqueadas con 100µL de seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en tampón fosfato salino 0,01M, pH 7,4 +/- 0,2 (PBS), a 4°C durante 18 a 24 horas aproximadamente, con el fin de eliminar reacciones inespecíficas (24). Luego, las placas fueron lavadas tres veces con solución de lavado, tampón fosfato salino 0,01M, pH 7,4 +/- 0,2, que contiene 0,5% Tween-20, pH 7,2 (PBS/T). Los sueros fueron agregados en concentración de 1:100 en PBS/T 0,05%/EDTA 10 mM, 100µL por pocillo, e incubados a 37°C por una hora. Luego de tres lavados en PBS/T se agregaron 100µL a cada pocillo de anti IgG canina conjugada a peroxidasa (A9042 Sigma®) en una dilución de 1:9000 en PBS y nuevamente incubadas a 37°C por una hora. Inmediatamente de los tres lavados en PBS/T, el paso final fue la adición, 100µL por pocillo, de una solución sustrato cromógeno compuesta por 1mM de ABTS (ácido 2,2'-azino bis [3-ethyl-benzthiazoline sulfónico]) y 4,4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,05M, pH 4,5 +/- 0,05. Las placas fueron incubadas por quince

minutos en agitación constante. La reacción enzimática se detuvo con una solución de sodio dodecil sulfato (SDS) al 4%. La lectura de las reacciones se realizó en un equipo INMUNOSKAN Plus® (BDSL) con un filtro de 405 nm, el cual entregó las absorbancias (DO).

- Para la interpretación de las lecturas, las DO fueron transformadas en porcentajes de positividad (PP). Así, el control positivo de la respectiva placa fue tomado como base para tal efecto y se consideró que éste poseyó un 100% de PP (2, 13).

- La línea de corte +/- o el “*cut off*” fue calculado utilizando el método de “*Receiver-Operator Characteristic*” (ROC) (18), utilizando el programa MedCalc para Windows versión 11.6.1. Los sueros con DO iguales o mayores al “*cut-off*” fueron considerados positivos.

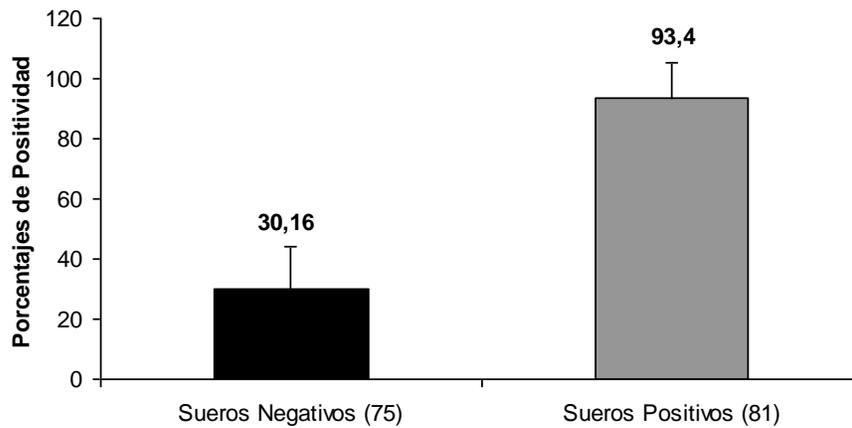
➤ Análisis de los resultados

- Con la finalidad de determinar la existencia de asociación entre ambas pruebas, los resultados fueron sometidos a la prueba de McNemar (G), basada en la aplicación de la distribución de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) (32). Además se determinó el grado de concordancia mediante el índice de Kappa de Cohen (21).

## RESULTADOS

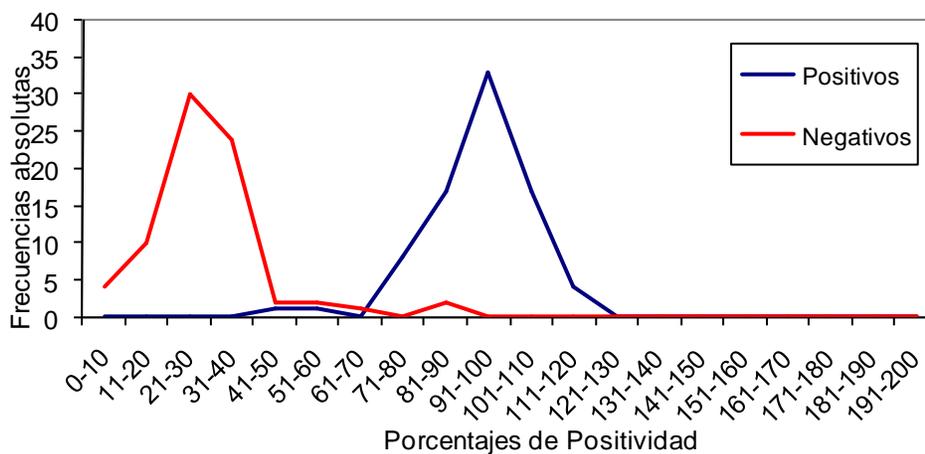
En el establecimiento de la fase sólida, se seleccionó la placa NUNC Polysorp, la cual entregó una RA de 8,74.

El resultado obtenido en el ELISA-I desarrollado frente a sueros positivos y negativos a la prueba CIEF se aprecia en el Gráfico 1.



**Gráfico 1:** Promedio de porcentajes de positividad (PP), obtenidos mediante ELISA-I con LPS-R de *B. abortus* CRB51, en sueros de perros positivos y negativos a CIEF.

A continuación, en el Gráfico 2 se muestra la distribución de los PP.



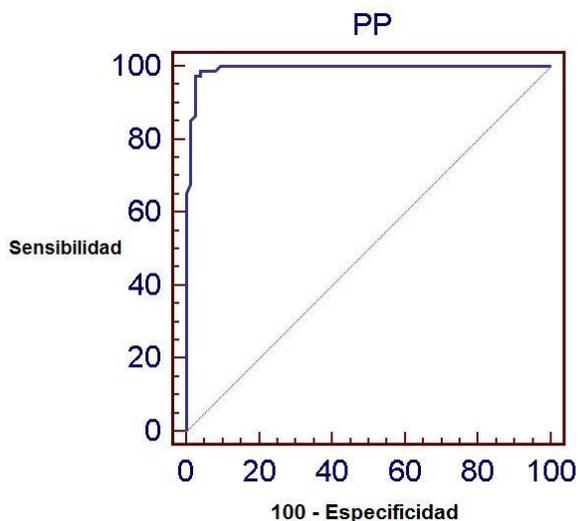
**Gráfico 2:** Distribución de porcentajes de positividad (PP), obtenidos mediante ELISA-I con antígeno LPS-R de *B. abortus* CRB51, en sueros de perros positivos y negativos a CIEF.

El “cut off” entregado por la metodología ROC fue de 65, así, cuando el promedio de PP de un suero fue igual o superior a 65% éste fue calificado como positivo a ELISA-I y si su promedio de PP fue menor a 65%, se le calificó como negativo a ella. El área bajo la curva fue de 0,993, con un intervalo comprendido entre 0,963 a 1,000. Con este punto de corte se obtuvo una sensibilidad de 97,53% y una especificidad de 97,33% respecto de CIEF (Cuadro 1).

**Cuadro 1:** Determinación de los niveles de sensibilidad y especificidad respecto a CIEF.

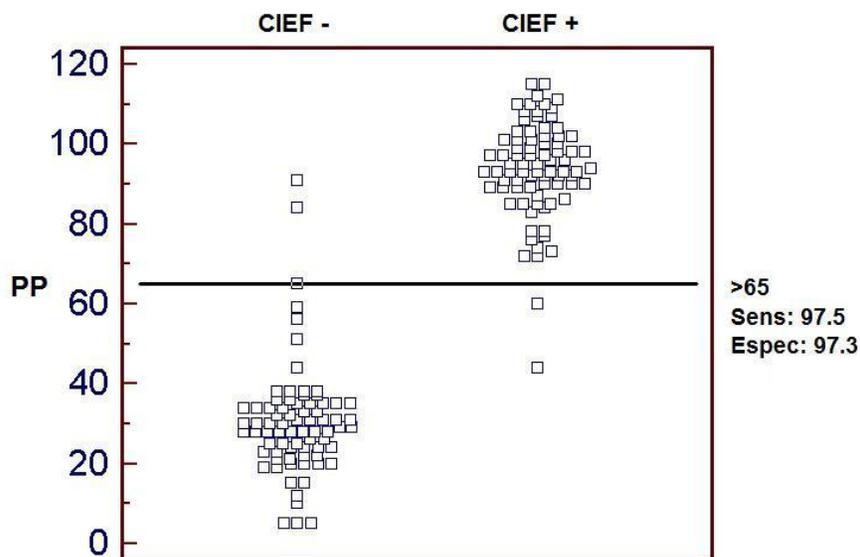
MÉTODO	CUT-OFF	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
ROC	65	97,53	97,33

La representación de la curva ROC se muestra en el Gráfico 3.



**Gráfico 3:** Representación del análisis ROC de los PP a ELISA-I para Brucelosis canina de grupos positivos y negativos a CIEF.

La distribución de frecuencias de los PP para los grupos de sueros positivos y negativos a CIEF utilizando el “cut-off” seleccionado se aprecia en el Gráfico 4.



**Gráfico 4:** Frecuencia de PP para los sueros positivos y negativos a CIEF para el diagnóstico de brucelosis canina.

En el cuadro 2 se observa el análisis estadístico realizado para comparar ambas pruebas. De un total de 81 sueros detectados positivos por la técnica de CIEF, 80 resultaron positivos a la técnica ELISA-I, encontrándose asociación entre ambas pruebas ( $p > 0,05$ ) y se determinó un alto índice de concordancia (K) (21).

**Cuadro 2:** Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación ELISA-I / CIEF.

<b>ELISA-I/ CIEF</b>	<b>CIEF</b>		
<b>G= 1,33 (P&gt;0,05)</b>	<b>NEG</b>	<b>POS</b>	
<b>K= 0,961 C=98,08%)</b>	<b>NEG</b>	73	1
	<b>POS</b>	2	80
		75	81
		156	

**G= Prueba de McNemar; K= Índice de concordancia; C= Porcentaje de resultados concordantes.**

## DISCUSIÓN

La infección por *B. canis* se encuentra mundialmente distribuida y al ser además una zoonosis, existe la necesidad de desarrollar pruebas de diagnóstico serológico que sean sensibles, específicas y con resultados cuantificables, para la detección de anticuerpos específicos contra la bacteria (11). Los métodos bacteriológicos de diagnóstico son complejos, requieren de medios y personal especializado y los resultados se obtienen luego de varios días, además poseen la desventaja que un cultivo sanguíneo negativo no descarta la infección (3, 35).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I) para el diagnóstico serológico de brucelosis canina, utilizando un antígeno LPS-R de *Brucella abortus* CRB51 que presentase antigenicidad cruzada con *B. canis*, fuese seguro y fácil de producir.

La eficiencia de una prueba diagnóstica depende en gran medida del tipo de antígeno y su calidad. Las diferentes técnicas empleadas para extraer antígenos a partir de bacterias, pueden interferir en la composición del mismo. En el caso de antígenos obtenidos a partir de *B. canis*, algunos autores han demostrado que el uso de antígenos citosólicos pueden entregar mayor sensibilidad y especificidad en el serodiagnóstico que aquellos antígenos de membrana (7), mientras que otros han argumentado que no existen diferencias relevantes (34). El método de extracción propuesto por Galanos *et al.* (1969) y utilizado en este trabajo permite obtener un antígeno LPS-R a partir de *B. abortus* CRB51 altamente purificado, que brindaría propiedades beneficiosas en el diagnóstico de brucelosis canina. La preparación de este antígeno requirió de un tiempo relativamente corto y se logró extraer un antígeno de gran calidad.

Inicialmente se logró establecer una fase sólida con el antígeno preparado, el cual se adhirió de mejor manera a la placa NUNC Polysorp, permitiendo una posterior unión de anticuerpos caninos reactivos contra este antígeno. Esto se pudo corroborar con las absorbancias (DO) entregadas por los "pool" positivo y negativo, cuya RA fue mayor a seis. De esta manera se confirmó lo dicho por otros autores (22, 27), que así como *B. ovis*

y *B. canis* comparten componentes antigénicos, también lo hacen con el LPS-R de *B. abortus* CRB51. Los otros dos tipos de placas ensayadas no demostraron tener buenas propiedades en cuanto al establecimiento de la fase sólida y posterior desarrollo del ELISA-I, ya que las RA obtenidas fueron deficientes.

Para evaluar la eficiencia diagnóstica de una prueba de este tipo es ideal contar con muestras de animales infectados y no infectados con *B. canis* confirmados mediante el aislamiento de la bacteria. Como en este estudio no se contó con este tipo de muestras, se recurrió a la prueba de CIEF como método de comparación. Esta prueba es empleada rutinariamente para el diagnóstico de brucelosis canina en el Laboratorio de Microbiología de FAVET, utilizando un antígeno de *B. ovis* extraído por el método de salina caliente (HS) y que contiene además del LPS-R, proteínas de membrana celular, lo que lo convierte en un antígeno medianamente purificado.

Las diluciones de trabajo finalmente utilizadas, se encuentran dentro de los rangos descritos previamente en trabajos de otros autores (4, 12). Lo mismo ocurrió con la etapa de bloqueo (BSA al 2%) para evitar las uniones inespecíficas durante el establecimiento de la fase sólida (16, 24).

Al probar los sueros negativos y positivos a CIEF, se apreció que el promedio de PP fue de 30,16% y 93,74% para los sueros negativos y positivos, respectivamente (Gráfico 1). Lo anterior se explica de mejor manera en el Gráfico 2, donde la dispersión de los PP para ambos grupos de sueros, se encontró bastante distanciada, siendo la sobreposición entre ambos muy baja, lo que se puede interpretar como que existiría una clara diferenciación entre sueros positivos y negativos.

La existencia de asociación entre las pruebas ( $p > 0,05$ ) de CIEF y ELISA-I (Cuadro 2) sugiere que ambas tienen aplicabilidad semejante. Este resultado invita a continuar las investigaciones en el área, para luego instaurar y estandarizar la técnica ELISA-I como diagnóstico serológico de rutina para brucelosis canina. Lo anterior en base a que se ha demostrado que en términos de sensibilidad, las pruebas ELISA, serían superiores a otras técnicas serológicas, ya que entregan resultados inmediatos, cuantitativos, fáciles de realizar, estandarizar y aplicables a un gran número de muestras (11).

El alto índice de concordancia obtenido entre las pruebas (CIEF y ELISA-I) pronosticaría un buen resultado (Cuadro 2). López de Ullibarri *et al.* (1999) reportaron que los valores del índice Kappa entre 0,01-0,2 son indicativos de pobre, 0,21-0,40 débil, 0,41-0,60 moderada, 0,61-0,80 buena y 0,81-1,00 muy buena fuerza de la concordancia entre dos variables. Es por esto, que el resultado obtenido es indicativo de una alta concordancia entre la técnica de CIEF y el ELISA-I propuesto.

Sensibilidad y especificidad son dos importantes características en una prueba diagnóstica. Para seleccionar el “*cut-off*”, se recurrió al método ROC (Gráfico 3 y 4), utilizado anteriormente, en estudios semejantes, por diversos autores (2, 12, 22). Esta metodología permite elegir entre distintos valores de sensibilidad y especificidad entregados por el programa, permitiendo seleccionar aquella combinación que entrega el menor porcentaje de error total. Al evaluar el ELISA-I desarrollado, encontramos una alta sensibilidad, valor que alcanzó un valor de 97,53% y una especificidad de 97,33% (Cuadro 1). Este resultado es coherente con trabajos anteriores que utilizan la cepa RB51 como antígeno en una prueba de ELISA-I para el diagnóstico de *B. canis* (27).

Finalmente, podemos decir que este estudio preliminar demostró que la aplicación del antígeno LPS-R de *B. abortus* CRB51 y la optimización de la técnica en base al correcto ajuste de parámetros de concentración de los distintos reactivos, entregaron buenos valores de sensibilidad y especificidad relativos. Aún cuando, es importante notar que ninguno de los métodos diagnósticos comúnmente empleados es, por sí solo, adecuado para entregar un diagnóstico definitivo en todos los casos. La decisión debe tomarse entonces sobre la base de los resultados bacteriológicos en conjunto con las pruebas serológicas, así como una evaluación de los signos clínicos (14).

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Abalos P, Pinochet L, Fábrega F.** 1993. Desarrollo de una prueba de ELISA para descartar respuestas postvacunales con Cepa19, utilizando un antígeno soluble polisacárido de *Brucella abortus* 1119-3. *Av Cs Vet* 8: 138-43
2. **Araya A.** 1999. Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnóstico serológico de brucelosis canina. Memoria de Título. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 56p
3. **Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Fossati CA.** 1994. *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol* 41: 127-34
4. **Barrouin-Melo SM, Poester FP, Ribeiro MB, De Alcantara AC, Aguiar PH, Nascimento IL, et al.** 2007. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. *Res Vet Sci* 83: 340-6
5. **Borie C, Pinochet L.** 1987. Brucelosis canina: Conceptos generales y estudios realizados en el país. *Mon Med Vet* 9: 70-8
6. **Carmichael LE.** 1990. *Brucella canis*. In: *Animal Brucellosis*, ed. KH Nielsen, JR Duncan. CRC Press, Boca Raton. Florida, USA. 336-350
7. **Carmichael LE, Joubert JC.** 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet* 77: 3-12
8. **Carmichael LE, Shin SJ.** 1996. Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 11: 161-5
9. **CloECKaert A, Vizcano N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH.** 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol* 90: 229-47
10. **Cutlet SJ, Whatmore AM, Commander NJ.** 2005. Brucellosis-new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* 98: 1270-81
11. **De Oliveira MZ, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, et al.** 2010. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res Vet Sci* 90: 425-31

12. **Escobar GI, Boeri EJ, Ayala SM, Lucero NE.** 2010. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. *Rev Argent Microbiol* 42: 35-40
13. **FAO/IAEA.** 1993. Brucellosis ELISA kit manual. In: *Joint FAO/IAEA Division. Agriculture Laboratory. Animal Production and Health unit.* Seibersdorf, Austria. 35p
14. **Flores-Castro R, Carmichael LE.** 1978. Canine brucellosis. Current status of methods for diagnosis. *Cornell Vet* 68 Suppl 7: 76-88
15. **Galanos C, Luderitz O, Westphal O.** 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 9: 245-9
16. **Gibbs J.** 2001. Effective Blocking Procedures. ELISA Technical Bulletin N°3. Disponible en: <http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/elisa3.pdf> [Citado en Ago 2011].
17. **Hollett RB.** 2006. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 66: 575-87
18. **Jacobson RH.** 1996. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.* OIE. France, París. 8-15.
19. **Jahans KL, Foster G, Broughton ES.** 1997. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 57: 373-82
20. **Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao DP, Salgado VR, et al.** 2007. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology* 68: 1260-70
21. **López De Ulibarri I, Pita S.** 1999. Medidas de concordancia: El Índice Kappa. *Unidad de Epidemiología clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo.*: 169-71
22. **López G, Ayala SM, Escobal GI, Lucero NE.** 2005. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 105: 181-7
23. **Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, López G.** 2002. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol* 51: 656-60
24. **Marambio C.** 2007. Establecimiento de una fase sólida con un antígeno LPS-R de *Brucella abortus* cepa RB51, para la detección de anticuerpos contra LPS-R de *Brucella ovis*. Memoria de Título. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 40p

25. **Martin-Martin AI, Sancho P, Tejedor C, Fernandez-Lago L, Vizcano N.** 2011. Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Vet Journal* 189(1): 103-5
26. **Mateu-De-Antonio EM, Martin M, Soler M.** 1993. Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am J Vet Res* 54: 1043-6
27. **Nielsen K, Smith P, Conde S, Dragui De Benitez G, Gall D, Halbert G, 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. *J Immunoassay Immunochem* 25: 171-82
28. **Nielsen K, Smith P, Gall D, Perez B, Cosma C, Mueller P, et al.** 1996. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet Microbiol* 52: 165-73
29. **Olsen S, Tatum F.** 2010. Bovine brucellosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26: 15-27
30. **Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A.** 2006. *Brucella abortus*: Inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch Med Vet* 38: 7-18
31. **Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N.** 2010. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.* 140: 392-8
32. **Sierra R.** 1985. Técnicas de investigación social: teoría y ejercicios. Paraninfo editorial. Madrid, España 542-603
33. **Wanke M.** 2004. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci* 82-83: 195-207
34. **Wanke M, Del Pino MV, Baldi PC.** 2002. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol* 88: 367-75
35. **Zoha SJ, Carmichael LE.** 1982. Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). *Vet Microbiol* 7: 35-50