

## Desarrollo y validación de dos inmunoensayos para la detección de *Brucella canis* en perros

Development and validation of two immunoassays for the detection of *Brucella canis* in dogs

Palacios-Rodríguez Victor <sup>ID</sup>, Arellano-Reynoso Beatriz\* <sup>ID</sup>, Benítez-Guzmán Alejandro <sup>ID</sup>, Morales-Aguilar Aldo <sup>ID</sup>, Suárez-Güemes Francisco <sup>ID</sup>

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México. C. P. 04510. Autor para correspondencia: Beatriz Arellano-Reynoso. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México. C. P. 04510. [mvzpalaciosr@gmail.com](mailto:mvzpalaciosr@gmail.com), [arerey@yahoo.com](mailto:arerey@yahoo.com), [ale.benitezg@gmail.com](mailto:ale.benitezg@gmail.com), [aldomorales.ag@gmail.com](mailto:aldomorales.ag@gmail.com), [fsg@unam.mx](mailto:fsg@unam.mx).

### RESUMEN

La brucelosis canina es causa de falla reproductiva y la detección temprana en los perros infectados sigue siendo un desafío. El objetivo del presente estudio fue probar dos antígenos para ser utilizados en dos diferentes inmunoensayos, para la detección de infección por *Brucella canis* en perros: uno a partir de antígeno crudo sonicado de *Brucella canis* RM6/66 (AC-iELISA) y otro utilizando la proteína inmunodominante GroEL (GroEL-iELISA). Se determinó el punto de corte usando sueros de perros infectados; posteriormente, se midió la reproducibilidad y se obtuvo un coeficiente de variación (CV) debajo de 15 % para negativos y positivos con el AC-iELISA, mientras que, para el GroEL-iELISA fueron superiores a 15 %. En la prueba de robustez, hubo diferencias significativas para el GroEL-iELISA, más no para el AC-iELISA. La prueba de selectividad mostró reacción cruzada con *Leptospira interrogans* en el AC-iELISA, y con *L. interrogans* y *Salmonella* spp. en el GroEL-iELISA. A partir de las pruebas de la estabilidad de la muestra se demostró que éstas deben almacenarse a temperatura ambiente no más de 2 horas, a 4 °C no más de 24 horas y pueden mantenerse a -20 °C hasta 30 días. Finalmente, se calcularon la sensibilidad y especificidad, resultando 100 % ambas para el AC-iELISA; una sensibilidad de 44 % y especificidad de 67 % para el GroEL-iELISA. En conclusión, el AC-iELISA demostró ser mejor en detectar a *Brucella canis* que el GroEL-iELISA.

**Palabras clave:** *Brucella canis*, Brucelosis canina, GroEL, ELISA.

### ABSTRACT

Canine brucellosis is a cause of reproductive failure and early detection in infected dogs remains a challenge. The aim of the present study was to test two antigens to be used in two different immunoassays for the detection of *Brucella canis* infection in dogs: one from *Brucella canis* RM6/66 sonicated crude antigen (CA-iELISA) and the other using the immunodominant protein GroEL (GroEL-iELISA). The cut-off point was determined using sera from infected dogs; subsequently, reproducibility was measured and a coefficient of variation (CV) below 15 % was obtained for negatives and positives with the CA-iELISA, whereas, for the GroEL-iELISA they were higher than 15 %. In the robustness test, there were significant differences for the GroEL-iELISA, but not for the CA-iELISA. The selectivity test showed cross-reactivity with *Leptospira interrogans* in the CA-iELISA, and with *L. interrogans* and *Salmonella* spp. in the GroEL-iELISA. From the sample stability tests, it was demonstrated that samples should be stored at room temperature for no more than 2 hours, at 4 °C for no more than 24 hours and can be kept at -20 °C for up to 30 days. Finally, sensitivity

and specificity were calculated, resulting in 100 % for both CA-iELISA; sensitivity of 44 % and specificity of 67 % for GroEL-iELISA. In conclusion, the CA-iELISA proved to be better at detecting *Brucella canis* than the GroEL-iELISA.

**Keywords:** *Brucella canis*, Canine Brucellosis, GroEL, ELISA.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es la zoonosis bacteriana más extendida en todo el mundo (Corbel, 2006). Sin embargo, sigue siendo una de las enfermedades a las que menos se presta atención como posible causa de afecciones crónico-degenerativas (Hull y Schumaker, 2018). La Brucelosis canina fue descrita por Leeland Carmichael en 1966, tras aislar el agente *Brucella canis* de Beagles con problemas reproductivos (Cosford, 2018). Es la causa más común de fallo reproductivo en perros, (Hensel *et al.*, 2018) afectando principalmente a perros domésticos y de refugio (Hubbard *et al.*, 2018) en los que la fiebre se acompaña de epididimitis, prostatitis y fallo reproductivo, además de manifestaciones no reproductivas como linfadenitis, uveítis, endoftalmitis, dermatitis piogranulomatosa, meningoencefalitis y discospondilitis (Cosford, 2018; Wanke, 2004). La detección se basa actualmente en el aislamiento del agente mediante cultivo bacteriano y seroaglutinación (Cosford, 2018). Sin embargo, el diagnóstico serológico es problemático en la identificación de casos crónicos, y el cultivo presenta un riesgo para el personal de laboratorio (Hull y Schumaker, 2018). Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos para la detección de este microorganismo, y los métodos serológicos son ideales dada su facilidad de uso y fiabilidad demostrada (Cosford, 2018; Hull y Schumaker, 2018). Sin embargo, estos métodos requieren un buen control de calidad, por lo que deben ser validados antes de ser utilizados en el campo (Andreasson *et al.*, 2015).

El objetivo de este estudio es establecer un método serológico (I - ELISA) para la detección de anticuerpos de *Brucella canis* en perros, utilizando como antígeno de captura la proteína chaperona GroEL de 60 kDa, y un antígeno crudo sonificado (CA). Finalmente, comparar el rendimiento de ambos inmunoensayos y determinar las condiciones para su máxima utilidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales y sueros

Para este estudio se utilizaron sueros de 10 perros beagle infectados experimentalmente con *B. canis*, obtenidos en un trabajo previo, amablemente donados por Efrén Díaz (CENID SAI; INIFAP SAGARPA, México) (Tuxpan Galván, 2015), confirmados por la prueba de aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT) y el aislamiento bacteriano de las muestras de sangre. Brevemente, los animales fueron inoculados por instilación en la conjuntiva con  $5 \times 10^6$  UFC/ml de una cepa de campo de *B. canis*, se tomaron muestras de sangre a diferentes días post infección y se cultivaron en medio Ruiz-Castañeda. La

identificación de *Brucella canis* se realizó mediante pruebas bioquímicas de rutina según la metodología descrita por Alton (1988).

Se utilizaron sueros de 10 perros clínicamente sanos, cuya última vacunación contra cualquier agente fue al menos seis meses antes de la toma de muestras y que dieron un resultado negativo en el RSAT (Carmichael y Joubert, 1987). Para las pruebas de selectividad, se utilizaron tres sueros de perros con infecciones de *Leptospira interrogans* confirmadas por la prueba de aglutinación microscópica, dos sueros de perros recientemente vacunados contra *L. interrogans*, Adenovirus canino tipo 1 y 2, y Moquillo canino, y suero de un perro positivo para infección gastrointestinal con *Salmonella* spp., confirmado por cultivo. Todos estos sueros provenían del stock de sueros del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### Antígenos

El antígeno crudo (AC) se obtuvo mediante la sonicación de la cepa RM6/66 de *B. canis* utilizando un método previamente descrito (de Oliveira et al., 2011); brevemente, se tomaron 2 g de biomasa de *B. canis* inactivada por calor (75 °C durante 1 h) y se colocaron en 10 mL de una solución que contenía 10 mM de HEPES pH 7.5, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Las bacterias fueron así sonicadas (Vibra Cell VCX 130 - Sonics) (4 pulsos de 1 min a 15 Hz) en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, Saint Luis, Mo). Para corroborar la disrupción celular, se realizó una tinción de Gram. Una vez sonicada la biomasa bacteriana, se centrifugó a 700 x g durante 30 min a 4 °C para obtener la fracción soluble (sobrenadante).

La proteína purificada (GroEL) se obtuvo a partir de la fracción soluble mediante cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) utilizando una columna de intercambio aniónico (HiTrap Capto Q; GE Healthcare) con cromatografía líquida (AKTA Pure; GE Healthcare). La columna se tamponó con 5 mL de una solución de Tris-HCl (5 mM) y EDTA (10 mM), luego se introdujo la muestra con un flujo de 1 mL/min y se lavó con la solución descrita anteriormente. El tampón de elución (1 M NaCl) se incluyó en un gradiente lineal de 0 % a 100 % en nueve volúmenes de 1 mL cada uno. Cada fracción se obtuvo en un volumen de 0.5 mL y se resolvió mediante SDS-PAGE al 12 % por duplicado y se tiñó con azul de Coomassie o se transfirió a una membrana de PVDF para la inmunotransferencia, utilizando sueros de perros infectados; además se utilizó anti IgG de perro como anticuerpo secundario (1:10000) y ECL West femto como sustrato (ThermoFisher, Carlsbad, California). Posteriormente, las fracciones se concentraron 3 veces en un Amicon ultra 50kDa (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se resuspendieron en PBS y se seleccionaron dos fracciones que contenían dos bandas cada una (entre 55 kDa y 70 kDa), para resolverlas en un gel mediante enfoque isoeléctrico (EIE) (un total de 20 µg de proteína) seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional y se verificó la antigenicidad de cada mancha mediante Western blot con la ayuda de sueros de perros infectados por *B. canis*. Se identificaron

tres manchas como GroEL mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas, tal y como se describe en un trabajo anterior, con una cobertura del 29, 51 y 21 % para cada mancha (Morales Aguilar, 2016) (Material Suplementario).

### **Protocolo iELISA utilizando el antígeno crudo sonicado**

El ELISA con antígeno crudo (AC-iELISA) se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos de unión media (Nunc-Immuno Micro Well MaxiSorp; Sigma-Aldrich), añadiendo 240 ng de antígeno diluido en 100  $\mu$ L por pocillo en solución tampón fosfato (PSB); se homogeneizó a 100 rpm durante 5 min y se incubó a 37 °C durante 17 +/- 1 h. Se lavó tres veces con 200  $\mu$ l de una solución de PBS + Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0.1% (PBS-Tween 20). Se añadió una solución de albúmina de suero bovino (Bovine serum albumin; Sigma-Aldrich) diluida al 1 % en PBS (100  $\mu$ l por pocillo), se incubó durante 60 minutos a 37 °C y se lavó tres veces con 200  $\mu$ l de Tween 20 al 0.1 %. Se añadió el suero diluido en PBS 1:250 en 100  $\mu$ L, después se incubó a 37 °C durante 60 min, tras lo cual se lavó tres veces con 200  $\mu$ L de Tween 20 al 0.1 %. Se añadió una solución de 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario anti-IgG canina de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (anticuerpo secundario anti-IgG canina de conejo (H+L), HRP; Invitrogen), diluido 1:2000 en PBS (solución ABTS; Roche), se incubó a 37 °C durante 60 min y se lavó tres veces con 200  $\mu$ l de Tween 20 al 0.1 %. Por último, se añadieron 100  $\mu$ L de ABTS (Sigma-Aldrich) a cada pozo en la oscuridad y se incubaron con el pozo cubierto con papel de aluminio, a temperatura ambiente en agitación orbital a 100 rpm durante 25 min. Las placas se leyeron con un lector de ELISA (Biotek Instruments) a una longitud de onda de 405 nm utilizando el programa Gen5 (<https://www.biotek.es/es/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

### **iELISA protocol using GroEL**

Para la técnica que utiliza GroEL como antígeno de captura (GroEL - iELISA), se sensibilizó una placa de 96 pocillos (Nunc-Immuno Micro Well MaxiSorp; Sigma-Aldrich) utilizando 10 ng de proteína GroEL purificada diluida en suficiente solución tampón de carbonato (0.05 M, pH 9.6) para alcanzar un volumen de 100  $\mu$ l por pocillo. La placa se colocó en agitación orbital a 100 rpm durante 5 minutos, se cubrió con parafilm (Parafilm M; Merck) y se incubó a 4 °C durante 17  $\pm$  1 h, después se lavó tres veces con 200  $\mu$ l de Tween 20 al 0.1 %. Se añadieron 100  $\mu$ l de suero diluido 1:500 en PBS con albúmina de suero bovino a 1 g/L (0.1 M, pH 7), se cubrió con parafilm, se incubó durante 1 h a 37 °C y se lavó tres veces con Tween 20 al 0.1 %. Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de una dilución 1:2000 del anticuerpo anti-IgG canina de cabra con peroxidasa (anticuerpo secundario anti-IgG canina de cabra (H+L), HRP; Invitrogen) diluido en PBS (0.1 M, pH 7), se cubrió con parafilm y se incubó durante 1 h a 37 °C, después se lavó tres veces con Tween 20 al 0.1 %. Por último, se añadieron 100  $\mu$ L de ABTS a cada pocillo en la oscuridad, cubriendo la placa con papel de aluminio y colocándola en agitación orbital a

100 rpm durante 25 min. La lectura se realizó en un lector de ELISA (Bio-Tek/ELX808; Biotek) a una longitud de onda de 405 nm utilizando el software Gen5.

### Protocolo de validación interno

El punto de corte se determinó utilizando un método previamente descrito (Frey *et al.*, 1998) y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$PUNTO DE CORTE = \bar{X} + SD t\sqrt{1 + (1/n)}$$

Donde  $\bar{X}$  es la media de los resultados obtenidos de una serie de controles negativos,  $DS$  es la desviación estándar de esa serie de resultados,  $t$  es el percentil  $(1 - \alpha)$  de una distribución  $t$  de Student de una cola con  $(n - 1)$  grados de libertad, y  $n$  es el número de controles analizados. Los resultados se consideran positivos para la infección por *B. canis* si están por encima del resultado de este cálculo. A continuación, se evaluó la precisión mediante el cálculo de la precisión intermedia y la repetibilidad utilizando el material complementario de una guía, (Andreasson *et al.*, 2015) donde el Coeficiente de Variación (% CV) se calcula a partir de una serie de mediciones independientes en diferentes días (Precisión Intermedia), así como una serie de mediciones simultáneas (Repetibilidad). Además, se calcularon la media y la desviación estándar de estos parámetros, utilizando un control positivo y un control negativo. Las repeticiones se realizaron en cinco días diferentes, cinco veces cada uno. Se evaluó la robustez de las pruebas para los sueros positivos y negativos, variando en +/- 5 °C la temperatura de incubación de los sueros de referencia, utilizando 37 °C como temperatura de referencia. Del mismo modo, se varió el tiempo de incubación en +/- 5 min en comparación con el estándar; los resultados se compararon mediante un ANOVA y las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey (Andreasson *et al.*, 2015). La selectividad se evaluó utilizando sueros de perros positivos a enfermedades distintas de la *Bruceosis canina*. Para evaluar la estabilidad de la muestra, se prepararon 19 alícuotas de un control positivo y un control negativo y se sometieron a un proceso de congelación-descongelación para su comparación utilizando el siguiente protocolo: (Andreasson *et al.*, 2015).

1. Las alícuotas 1 a 6 se descongelaron a temperatura ambiente durante 2 h y luego se volvieron a congelar durante 12 h.
2. Las alícuotas 2 a 6 se descongelaron durante 2 h y se volvieron a congelar durante 12 h.
3. Los números 3 a 6 se descongelaron durante 2 h y se volvieron a congelar durante 12 h.
4. Los números 4 a 6 se descongelaron durante 2 h y se volvieron a congelar durante 12 h.

5. Los números 5 y 6 se descongelaron durante 2 h y se volvieron a congelar durante 12 h.
6. La alícuota 6 se descongeló durante 2 h. y se volvió a congelar durante 12 h.
7. Las muestras 7 a 12 se mantuvieron a temperatura ambiente desde el inicio de la evaluación; una alícuota se trasladó al congelador después de 1 h, una segunda alícuota después de 2 h, una tercera alícuota después de 4 h, una cuarta alícuota después de 24 h, una quinta alícuota después de 72 h y la sexta alícuota después de 168 h.
8. Las alícuotas 13 a 18 se mantuvieron a 4 °C desde el inicio de la evaluación y se trasladaron al congelador siguiendo el mismo proceso descrito en el punto 7.
9. La alícuota 19 se mantuvo a -20 °C y se analizó un mes después.

Por último, se comprobó la sensibilidad y la especificidad utilizando 10 sueros negativos y 10 positivos, ajustando los resultados según la fórmula descrita anteriormente para obtener el intervalo de confianza del 95 % (IC<sub>95%</sub>) (DasGupta *et al.*, 2001; Jacobson, 1998), mediante el siguiente cálculo:

$$A = 2r + 1.96^2$$
$$B = 1.96\sqrt{1.96^2 + 4r(1 - p)}$$
$$C = 2(n + 1.96^2)$$

Construyendo el intervalo de confianza como  $(A-B)/C$ ,  $(A+B)/C$ .

## RESULTADOS

### I-ELISA utilizando antígeno crudo sonicado

El punto de corte en 0.98 DO se calculó utilizando 10 controles negativos. En la prueba de precisión, se encontró que para el control negativo el CV fue del 3.7 % para la repetibilidad y del 13 % para la precisión intermedia, con una media de 0.5 DO; para el control positivo, el CV se calculó como 1.1 % para la repetibilidad y 3.8 % para la precisión intermedia, con una media de 3.0 DO.

Con respecto a los resultados del ANOVA para la robustez, hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) cuando se varió la temperatura, sin embargo, la prueba HSD de Tukey mostró que la diferencia era entre los resultados de la incubación del suero a 32 °C y 42 °C, no entre ninguno de ellos y la temperatura estándar de 37 °C; el ANOVA de los resultados de las pruebas variando los tiempos de incubación mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), que la prueba HSD de Tukey mostró entre los tiempos de incubación de 55 min y 65 min, así como entre cada uno de estos tiempos y el estándar de 60 min.

La prueba de selectividad permitió identificar un falso positivo utilizando suero de perros infectados con *L. interrogans*. La prueba de estabilidad de la muestra mostró una

variación significativa en la muestra negativa a partir de 4 h a 25 °C, 24 h en refrigeración (4 °C) y el segundo ciclo de congelación-descongelación, pero no hubo variación en la muestra que se mantuvo congelada (-20 °C) durante 30 días. En las alícuotas del control positivo, no hubo ninguna variación significativa durante todo el procedimiento. La prueba mostró una sensibilidad del 100 % (CI<sub>95%</sub> 70 - 100 %) y una especificidad del 100 % (CI<sub>95%</sub> 70 - 100 %).

### **I-ELISA con GroEL**

El punto de corte se calculó como 1,228 DO utilizando 10 controles negativos. En la prueba de precisión, para el control negativo el %CV fue del 4.6 % para la repetibilidad y del 12.9 % para la precisión intermedia, con una media de 0.7 DO. Para el control positivo, el % CV se calculó en un 8.1% para la repetibilidad y un 16.8% para la precisión intermedia, con una media de 1.3 DO. El ANOVA para la robustez mostró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) cuando se varió la temperatura, que la prueba HSD de Tukey identificó entre los resultados de los sueros incubados a 42 °C y la temperatura estándar (37 °C) y entre la incubación a 32 °C frente a 42 °C. Con respecto a las pruebas en las que se varió el tiempo de incubación, el ANOVA mostró diferencias significativas en los resultados entre 55 y 60 min, 60 y 65 min, y 55 y 65 min según la prueba HSD de Tukey. La prueba de selectividad permitió identificar un falso positivo de suero de perros infectados con *L. interrogans* y *Salmonella* spp. La prueba de estabilidad de la muestra mostró que, para los negativos, empezaron a producirse diferencias significativas a las 168 h a 25 °C, una semana en refrigeración y el segundo ciclo de congelación-descongelación, mientras que para los positivos no hubo diferencias, ni siquiera después de 168 h a 25 °C, 24 h en refrigeración y 7 ciclos de congelación-descongelación. Sin embargo, en ambos casos hubo una curva con variaciones significativas durante las primeras horas de almacenamiento de la muestra, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. Ni los positivos ni los negativos variaron cuando las muestras se almacenaron en estado de congelación hasta un mes. La prueba mostró una sensibilidad del 44 % (IC<sub>95%</sub> 18 - 73 %) y una especificidad del 67 % (IC<sub>95%</sub> 35 - 88 %).

## **DISCUSIÓN**

La Brucelosis Canina es una enfermedad cuyo riesgo epidemiológico potencial ha sido subestimado, ([Hensel et al., 2018](#); [Hubbard et al., 2018](#); [Hull y Schumaker, 2018](#); [Krueger et al., 2014](#)) dando lugar a un escaso interés investigador. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico para poder abordar este problema, y en este sentido los métodos serológicos juegan un papel importante ([Avijgan et al., 2019](#)). En este estudio se evaluaron dos antígenos diferentes de *B. canis* hasta sus límites en dos inmunoensayos diferentes para establecer las condiciones de rango en las que sirven para detectar los anticuerpos presentes en una muestra, y por tanto, su validez como

pruebas diagnósticas, ([Andreasson et al., 2015](#)) garantizando que puedan ser aplicadas en el campo.

El primer aspecto que se debe determinar es el punto de corte, ya que éste se utiliza como referencia para diferenciar entre muestras positivas y negativas durante el resto de las pruebas, así como las variaciones en los resultados. El método utilizado se basa en el cálculo probabilístico, que se ha preferido al método empírico ([Frey et al., 1998](#)), ya que ofrece una mayor seguridad a la hora de tomar decisiones sobre la positividad de una muestra. A continuación, se realizó una evaluación de la precisión basada en el cálculo de la repetibilidad y la precisión intermedia. Según la literatura, la precisión intermedia no debe superar la repetibilidad duplicada, ([Andreasson et al., 2015](#)) sin embargo, esta regla puede ser modificada dependiendo de la naturaleza del método que se valida. Por esta razón, para considerar si la técnica es reproducible, se utilizó como punto de referencia una precisión intermedia y una repetibilidad %CV inferior al 20 % ([Jacobson, 1998](#)). Bajo este criterio, tanto CA - iELISA como GroEL - iELISA han mostrado niveles aceptables de repetibilidad y precisión intermedia tanto para muestras positivas como negativas, lo que sugiere que se puede confiar en los resultados.

Al evaluar la robustez de la prueba AC - iELISA, encontramos que las muestras incubadas a diferentes temperaturas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el estándar; esta variable hace referencia a la interferencia que puede suponer un cambio brusco de temperatura dentro de la incubadora, y por tanto a la necesidad de una buena calibración y estabilidad del equipo. No fue así en el caso de la variación del tiempo de incubación, donde sí se encontraron diferencias. Por lo tanto, es necesario que el operador esté atento a los tiempos de incubación cuando utilice esta prueba para el diagnóstico. En el caso de GroEL - iELISA, hubo diferencias significativas cuando se aumentó la temperatura, así como cuando se modificó el tiempo de incubación, por lo que recomendamos que antes de realizar la prueba, el operador se asegure de que la temperatura del equipo se mantenga por encima de 37 °C y por debajo de 42 °C, así como que se respeten los tiempos de incubación propuestos. Esta variable depende totalmente del operador.

Al evaluar la selectividad de las pruebas, se encontró que la prueba AC - iELISA mostró positividad cruzada con perros infectados con *Leptospira* spp. En la prueba GroEL - iELISA, hubo una reacción cruzada adicional con *Salmonella* spp. La reacción cruzada con *Leptospira* spp ha sido descrita previamente en otros métodos serológicos (Rosa de Bengala) en bovinos vacunados contra esta espiroqueta, ([de Faria Naves et al., 2012](#)) además, esto ha sido reportado en perros por comunicación personal (Moreno-Torres A, 2018). Por otra parte, en la única literatura que aborda específicamente esta cuestión, no se encontró ninguna reacción cruzada entre *B. canis* y *Leptospira* spp utilizando la prueba RSAT ([Krecic, 2019](#)). Este estudio es, por tanto, el primero en demostrar una reacción

cruzada entre *B. canis* y *Leptospira* spp. Debido a la naturaleza de los antígenos de captura utilizados como referencia, y a la falta de reacciones positivas a los mismos en un método basado en la detección de antígenos de membrana, podemos inferir que los antígenos responsables de la interferencia son de origen citosólico. Esta proteína chaperona se expresa abundantemente en los biofilms de *Leptospira* spp (Vinod Kumar *et al.*, 2017) lo que sugiere una posible relación entre la formación de estos biofilms y la alta exposición a GroEL que genera anticuerpos contra estas moléculas, aunque esta cuestión queda fuera del alcance de este estudio. Además, se ha descubierto que el GroEL de *Salmonella* spp es altamente homólogo al GroEL de *Escherichia coli*, y ambos son altamente homólogos a una proteína presente en *Brucella* spp., (Panchanathan, 1998; Sekhavati *et al.*, 2015) lo que podría explicar la reacción cruzada en la prueba GroEL - iELISA con *Salmonella* spp. Para responder a esta pregunta, es necesario abordar el problema desde una perspectiva molecular o bioinformática para determinar las similitudes entre el GroEL de las dos especies de bacterias. Hay otros patógenos que se sabe que causan reacciones cruzadas con *Brucella* spp. (Mol *et al.*, 2020), esas posibles interferencias en el diagnóstico deberían estudiarse en el futuro para descartar reacciones cruzadas. Uno de los más conocidos es el caso de *Yersinia enterocolitica*, que interfiere en la detección de *B. melitensis* y *B. abortus*; sin embargo, hasta la fecha no hay datos publicados que indiquen que este patógeno afecte a diferentes pruebas serológicas de *B. canis*. En cambio, Hurvell demostró en 1972 que los antígenos de *Yersinia enterocolitica* no presentan reacciones cruzadas con las Brucellas rugosas, es decir, *B. canis* y *B. ovis* (Hurvell, 1972).

Basándose en los resultados de la prueba de estabilidad, se recomienda que las muestras para AC - iELISA se conserven a 25 °C durante menos de cuatro horas, en refrigeración durante menos de 24 horas, siendo la congelación el método preferido de almacenamiento de las muestras, ya que se obtuvieron resultados fiables incluso después de un mes de congelación. Para el GroEL - iELISA, se recomienda que las muestras no se dejen más de una hora a temperatura ambiente o en refrigeración y que se coloquen inmediatamente en un congelador para garantizar la fiabilidad de los resultados.

La sensibilidad y la especificidad calculadas para AC - iELISA son buenas, pero el intervalo de confianza es demasiado laxo debido al número de muestras utilizadas, por lo que deben interpretarse teniendo esto en cuenta. Lo mismo ocurre con GroEL - iELISA. Dado que para la validación "in-house" de las pruebas serológicas no se requiere la determinación de la sensibilidad y la especificidad según el método descrito por Andreasson (Andreasson *et al.*, 2015), en este trabajo no se incluyó un mayor número de muestras, sino que se decidió calcular estos parámetros con el único fin de obtener un punto de comparación entre las pruebas que nos acerque a posibles escenarios a la hora de utilizarlo en la práctica clínica diaria. En futuros trabajos se deberían analizar más

muestras que permitan una estimación más precisa de los parámetros, con el fin de utilizar algunas de estas pruebas para estudios epidemiológicos. Dado que ese no era el objetivo de este estudio, no exploramos más esta cuestión.

Por último, la comparación entre las pruebas presentadas en este estudio refuerza la idea de que el uso de diversos antígenos en una prueba de diagnóstico es preferible al uso de un único antígeno (Wanke *et al.*, 2002). No obstante, la discusión sobre si los antígenos citosólicos son más útiles en el diagnóstico que los antígenos de membrana sigue abierta, ya que se observó un mejor rendimiento en la prueba que utilizó una mezcla de antígenos de ambos orígenes que en la prueba que utilizó únicamente el antígeno citosólico.

La Brucelosis Canina es una enfermedad que requiere más atención e investigación. Así, el desarrollo de métodos de diagnóstico con un adecuado control de calidad permitirá futuras investigaciones que exploren más profundamente el impacto de esta enfermedad en la salud humana y animal y nos conduzca a la mejora de las estrategias de prevención y control siguiendo la filosofía de Una Salud.

### CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los puntos anteriores, se puede concluir que AC-iELISA no sólo funcionó mejor que GroEL - iELISA, sino que, dados los resultados obtenidos, es una prueba de diagnóstico útil para la brucelosis canina en el campo. Dado que no sólo detecta los antígenos de la membrana externa, sino también los antígenos citosólicos, AC - iELISA es más útil para el diagnóstico que las pruebas de inmunoaglutinación. AC-iELISA también permite abordar la respuesta inmunitaria del huésped de forma semicuantitativa (no sólo cualitativa), lo que lo hace potencialmente útil para que el veterinario de primer contacto controle serológicamente al paciente durante el tratamiento.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Díaz-Aparicio Efrén por sus amables comentarios a la versión final y a Moreno-Torres Azaf por la comunicación personal sobre la reacción cruzada entre *Brucella* spp y *Leptospira* spp. Víctor Palacios-Rodríguez recibió una beca por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI) de México, CONACYT.

### FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación fue financiado por la DGAPA-UNAM, proyecto PAPIIT N° IT201017.

### CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declararon no tener ningún conflicto de intereses con respecto a la investigación, la autoría y/o la publicación de este artículo.

**Material Suplementario.** Las figuras 1-4 muestran el proceso de purificación de la proteína GroEL. La tabla 1 corresponde a la identificación de la proteína por cromatografía líquida-espectrometría de masas.

## LITERATURA CITADA

ALTON GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA. Pp. 34-60. ISBN: 2-7380-0042-8.

ANDREASSON U, Perret-Liaudet A, Van Waalwijk Van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB, Kulic L, Lewczuk P, Mollenhauer B, Mroczo B, Parnetti L, Vanmechelen E, Verbeek MM, Winblad B, Zetterberg H, Koel-Simmelink M, Teunissen CE, 2015. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front. Neurol.* 6. ISSN: 1664-2295. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00179>

AVIJGAN M, Rostamnezhad M, Jahanbani-Ardakani H, 2019. Clinical and serological approach to patients with brucellosis: A common diagnostic dilemma and a worldwide perspective. *Microb. Pathog.* 129:125–130. ISSN: 08824010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.011>

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. ISSN: 0010-8901 0010-8901. ISSN: 0010-8901 0010-8901. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19870067207>

CORBEL M, 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. ISBN: 92 4 154713 8. <https://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf?ua=1>

COSFORD KL, 2018. *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *Can Vet J.* 59:8. PMID: PMC5731389 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731389/>

DASGUPTA A, Cai TT, Brown LD, 2001. Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Stat. Sci.* 16:101–133. ISSN: 0883-4237. <https://doi.org/10.1214/ss/1009213286>

DE FARIA NAVES JHF, Rezende LM, Ramos GC, Soares PM, Tavares TCF, França AMS, Neves SMN, Silva NAM, Lima-Ribeiro AMC, 2012. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24: 283–287. ISSN: 1040-6387, 1943-4936. <https://doi.org/10.1177/1040638711432004>

DE OLIVEIRA MZD, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, Barrouin-Melo SM, 2011. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res. Vet. Sci.* 90:425–431. ISSN: 00345288. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.004>

FREY A, Di Canzio J, Zurakowski D, 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J. Immunol. Methods.* 221:35–41. ISSN: 0022-1759 0022-1759. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7)

HENSEL ME, Negron M, Arenas-Gamboa AM, 2018. Brucellosis in Dogs and Public Health Risk. *Emerg. Infect. Dis.* 24:1401–1406. ISSN: 1080-6040, 1080-6059. <https://doi.org/10.3201/eid2408.171171>

HUBBARD K, Wang M, Smith DR, 2018. Seroprevalence of brucellosis in Mississippi shelter dogs. *Prev. Vet. Med.* 159:82–86. ISSN: 01675877. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.002>

HULL NC, Schumaker BA, 2018. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 8, 1500846. ISSN: 2000-8686. <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1500846>

HURVELL B, 1972. Serological cross-reactions between different *Brucella* species and *Yersinia Enterocolitica* immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Acta Vet. Scand.* 13: 472–483. <https://doi.org/10.1186/BF03547153>

JACOBSON RH, 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases: -EN- -FR- Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses -ES- Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Sci. Tech. OIE* 17:469–526. ISSN: 0253-1933. <https://doi.org/10.20506/rst.17.2.1119>

KAUFFMAN LK, Petersen CA, 2019. Canine Brucellosis: Old Foe and Reemerging Scourge. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 49:763–779. ISSN: 1878-1306 0195-5616. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.013>

KRECIC MR, 2019. Antibodies produced by dogs successfully challenged with live *Leptospira* spp. did not cross-react to *Brucella* antigen in a commercial rapid slide agglutination test that detects antibodies to *Brucella canis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 31:83–85. ISSN: 1040-6387, 1943-4936. <https://doi.org/10.1177/1040638718820908>

KRUEGER WS, Lucero NE, Brower A, Heil GL, Gray GC, 2014. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. *Zoonoses Public Health.* 61:509–518. ISSN: 1863-2378 1863-1959. <https://doi.org/10.1111/zph.12102>

MOL JPS, Guedes ACB, Eckstein C, Quintal APN, Souza TD, Mathias LA, Haddad JPA, Paixão TA, Santos RL, 2020. Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32(1):77-86.

<https://doi.org/10.1177/1040638719891083>

MORALES AGUILAR A. 2016. [Estandarización de una prueba de ELISA indirecta a partir de proteínas inmunodominantes de *Brucella canis*] Standardization of an indirect ELISA from immunodominant proteins of *Brucella canis*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México. URI: [https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\\_UNAM/TES01000750502](https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000750502)

PANCHANATHAN V, 1998. Immunogenic epitopes of *Salmonella typhi* GroEL heat shock protein reactive with both monoclonal antibody and patients sera. *Immunol. Lett.* 62:105–109. ISSN: 01652478. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00028-5)

SEKHAVATI MH, Heravi RM, Tahmoorespur M, Yousefi S, Abbassi-Dalooi T, Akbari R, 2015. Cloning, molecular analysis and epitopes prediction of a new chaperone GroEL *Brucella melitensis* antigen. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 18:499–505. ISSN: 2008-3866 2008-3874 2008-3866. <https://dx.doi.org/10.22038/ijbms.2015.4414>

TUXPAN GMI, 2015. [Estudio de la mutante  $\Delta$ virB11::Gm<sup>r</sup> de *Brucella canis* para ser utilizada como vacuna en perros] Study of the *Brucella canis*  $\Delta$ virB11::Gm<sup>r</sup> mutant to be used as a vaccine in dogs. Tesis de Licenciatura. Tecnológico de estudios superiores de Huixquilucan, Estado de México, México.

VINOD KUMAR K, Lall C, Vimal Raj R, Vedhagiri K, Kartick C, Surya P, Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, 2017. Overexpression of heat shock GroEL stress protein in leptospiral biofilm. *Microb. Pathog.* 102:8–11. ISSN: 08824010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.010>

WANKE MM, 2004. Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83:195–207. ISSN: 03784320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.005>

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. *Vet. Microbiol.* 88:367–375. ISSN: 0378-1135 0378-1135. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00152-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00152-9)