

## Desenvolvimento e validação de dois imunoenaios para a detecção de *Brucella canis* em cães

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 correspondência: 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).

### RESUMO

A Brucelose canina é uma causa de falha reprodutiva e a detecção precoce em cães infectados continua a ser um desafio. O objectivo do presente estudo era testar dois antígenos a serem utilizados em dois imunoenaios diferentes para a detecção da infecção por *Brucella canis* em cães: um de *Brucella canis* RM6/66 antígeno sonicado bruto (AB-iELISA) e o outro utilizando a proteína imunodominante GroEL (GroEL-iELISA). O ponto de corte foi determinado utilizando soros de cães infectados; posteriormente, foi medida a reprodutibilidade e foi obtido um coeficiente de variação (CV) inferior a 15% para os negativos e positivos do AB-iELISA, enquanto que, para o GroEL-iELISA foram superiores a 15%. No teste de robustez, houve diferenças significativas para a GroEL-iELISA, mas não para a AB-iELISA. O teste de selectividade mostrou reactividade cruzada com *Leptospira interrogans* no AB-iELISA, e com *L. interrogans* e *Salmonella* spp. no GroEL-iELISA. A partir dos testes de estabilidade das amostras foi demonstrado que as amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente por não mais de 2 horas, a 4°C por não mais de 24 horas e podem ser mantidas a -20°C por até 30 dias. Finalmente, a sensibilidade e especificidade foram calculadas, resultando em 100% tanto para o AB-iELISA; sensibilidade de 44% e especificidade de 67% para o GroEL-iELISA. Em conclusão, o AB-iELISA provou ser melhor na detecção de *Brucella canis* do que o GroEL-iELISA.

**Palavras-chave:** *Brucella canis*, Brucelose 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.

## INTRODUÇÃO

A Brucelose é a zoonose bacteriana mais disseminada em todo o mundo (Corbel, 2006). No entanto, é ainda uma das doenças menos consideradas como causa potencial de doenças crônicas - degenerativas (Hull e Schumaker, 2018). A Brucelose Canina foi descrita por Leeland Carmichael em 1966, depois de isolar o agente *Brucella canis* de Beagles com problemas reprodutivos (Cosford, 2018). É a causa mais comum de falha reprodutiva em cães, (Hensel *et al.*, 2018) que afecta principalmente cães domésticos e de abrigo (Hubbard *et al.*, 2018) em que a febre é acompanhada de epididimite, prostatite, e falha reprodutiva, além de manifestações não reprodutivas como linfadenite, uveíte, endoftalmite, dermatite pirogranulomatosa, meningoencefalite, e discopondilite (Cosford, 2018; Wanke, 2004). A detecção é actualmente baseada no isolamento do agente por cultura bacteriana e seroaglutinação (Cosford, 2018). No entanto, o diagnóstico serológico é problemático na identificação de casos crónicos, e a cultura apresenta um risco para o pessoal do laboratório (Hull e Schumaker, 2018). Por conseguinte, é necessário desenvolver novos métodos para a detecção deste microorganismo, e os métodos serológicos são ideais dada a sua facilidade de utilização e fiabilidade demonstrada (Cosford, 2018; Hull e Schumaker, 2018). No entanto, estes métodos requerem um bom controlo de qualidade, e devem portanto ser validados antes de serem utilizados no terreno (Andreasson *et al.*, 2015).

O objectivo deste estudo é estabelecer um método serológico (I - ELISA) para a detecção de anticorpos de *Brucella canis* em cães, utilizando como antigénio de captura a proteína de 60 kDa chaperone GroEL, e um antigénio sonicado bruto (AB). Finalmente, para comparar o desempenho de ambos os imunoensaios e para determinar as condições para a sua máxima utilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e soros

Para este estudo, utilizámos soros de 10 cães bigle experimentalmente infectados com *B. canis*, obtidos num trabalho anterior, gentilmente doados por Efrén Díaz (CENID SAI; INIFAP SAGARPA, México) (Tuxpan Galván, 2015), confirmado por teste rápido de aglutinação de lâminas (RSAT) e isolamento bacteriano a partir de amostras de sangue. Em resumo, os animais foram inoculados por instilação na conjuntiva com  $5 \times 10^6$  UFC/ml duma estirpe de campo *B. canis*, as amostras de sangue foram colhidas em dias diferentes após a infecção e cultivadas em meio Ruiz-Castañeda. A identificação de *Brucella canis* foi realizada por testes bioquímicos de rotina, de acordo com a metodologia descrita por Alton (1988).

Foram utilizadas sereias de 10 cães clinicamente saudáveis, cuja última vacinação contra qualquer agente foi pelo menos seis meses antes da amostragem e que deu um resultado negativo no RSAT (Carmichael e Joubert, 1987). Para testes de selectividade, utilizámos três soros de cães com infecções por *Leptospira interrogans* confirmadas pelo teste microscópico de aglutinação, dois soros de cães recentemente vacinados contra *L. interrogans*, Adenovírus Canino tipo 1 e 2, e Distemper Canino, e soro de um cão positivo para infecção gastrointestinal com *Salmonella* spp., tal como confirmado pela cultura. Todos estes soros provêm da reserva de soros do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional Autónoma do México.

### Antigenes

O antígeno bruto (AB) foi obtido por sonicação da estirpe RM6/66 de *B. canis* utilizando um método previamente descrito (de Oliveira *et al.*, 2011); brevemente, 2 g de calor inactivado (75 °C durante 1 h) de biomassa de *B. canis* foram tomados e colocados em 10 mL duma solução contendo 10 mM HEPES pH 7,5, e armazenados a -20 °C até à sua utilização. As bactérias foram assim sonicadas (Vibra Cell VCX 130 - Sonics) (4 pulsos de 1 min a 15 Hz) na presença de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, Saint Luis, Mo). Para corroborar a disrupção celular, foi realizada uma coloração de Gram. Uma vez a biomassa bacteriana filtrada, foi centrifugada a 700 x g durante 30 min a 4 °C a fim de obter a fracção solúvel (sobrenadante).

A proteína purificada (GroEL) foi obtida da fracção solúvel por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) utilizando uma coluna de troca de aniões (HiTrap Capto Q; GE Healthcare) com cromatografia líquida (AKTA Pure; GE Healthcare). A coluna foi tamponada com 5 mL de uma solução de Tris-HCl (5 mM) e EDTA (10 mM), depois a amostra foi introduzida com um intervalo de fluxo de 1 mL/min e lavada com a solução previamente descrita. O tampão de eluição (1 M NaCl) foi incluído num gradiente linear de 0 a 100 % em nove volumes de 1 mL cada. Cada fracção foi obtida num volume de 0,5 mL e foi resolvida por 12 % de SDS-PAGE em duplicado e corada com Coomassie Blue ou transferida para uma membrana PVDF para immunoblotting, utilizando soros de cães infectados; foram ainda utilizados anticorpos anti-IgG para cães como anticorpo secundário (1:10000) e ECL West femto como substrato (ThermoFisher, Carlsbad, Califórnia). Subsequentemente, as fracções foram concentradas 3 vezes num Amicon ultra 50kDa (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e ressuspendidas em PBS e duas fracções contendo duas bandas cada (entre 55 kDa e 70 kDa), foram seleccionadas para serem resolvidas num gel utilizando focalização isoeléctrica (FIE) (um total de 20 µg de proteína) seguida de electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e a antigenicidade de cada mancha foi verificada por mancha ocidental com a ajuda de soros de *B. canis* infectados por cães. Três manchas foram identificadas como GroEL por cromatografia líquida - espectrometria de massa como descrito num trabalho anterior,

com uma cobertura de 29, 51 e 21 % para cada mancha ([Morales Aguilar, 2016](#)) ([Material Suplementar](#)).

### **Protocolo iELISA utilizando o antígeno bruto sonicado**

O ELISA utilizando antígeno bruto (AB-iELISA) foi feito em placas de poliestireno de ligação média de 96 poços (Nunc-Immuno Micro Well MaxiSorp; Sigma-Aldrich), adicionando 240 ng de antígeno diluído em 100 µL por poço em solução tampão fosfato (PBS); esta foi homogeneizada a 100 rpm durante 5 min e incubada a 37 °C durante 17 +/- 1 h. Foi lavado três vezes com 200 µL de uma solução de PBS + Tween 20 (Tween 20; Sigma-Aldrich) a 0,1 % (PBS-Tween 20). Adicionou-se uma solução de albumina de soro bovino (albumina de soro bovino; Sigma-Aldrich) diluída a 1 % em PBS (100 µL por poço), depois incubada durante 60 min a 37 °C e lavada três vezes com 200 µL de Tween 20 a 0,1 %. O soro diluído em PBS 1:250 em 100 µL foi adicionado, depois incubado a 37 °C durante 60 min, e depois lavado três vezes com 200 µL de Tween 20 a 0,1 %. Adicionou-se uma solução de 100 µL de IgG anticanina de coelho conjugada com anticorpo secundário de peroxidase de rábano silvestre (anticorpo secundário de IgG anticanina de coelho (H+L), HRP; Invitrogen), diluída 1:2000 em PBS, (solução ABTS; Roche), incubada a 37 °C durante 60 min, e lavada três vezes com 200 µL de Tween 20 a 0,1 %. Finalmente, foram adicionados 100 µL de ABTS (Sigma-Aldrich) a cada poço no escuro e incubados com o poço coberto com folha de alumínio, à temperatura ambiente em agitação orbital a 100 rpm durante 25 min. As placas foram lidas utilizando um leitor ELISA (Biotek Instruments) a um comprimento de onda de 405 nm, utilizando o programa Gen5 (<https://www.biotek.es/es/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

### **Protocolo iELISA usando o GroEL**

Para a técnica que utiliza GroEL como antígeno de captura (GroEL - iELISA), uma placa de 96 poços (Nunc-Immuno Micro Well MaxiSorp; Sigma-Aldrich) foi sensibilizada usando 10 ng de proteína GroEL purificada diluída em solução tampão carbonato suficiente (0,05 M, pH 9,6) para atingir 100 µL de volume por poço. A placa foi colocada em agitação orbital a 100 rpm durante 5 min, coberta com parafilm (Parafilm M; Merck) e incubada a 4 °C durante 17 ± 1 h, depois lavada três vezes com 200 µL de Tween 20 a 0,1 %. 100 µL de soro diluído 1:500 em PBS com albumina de soro bovino a 1 g/L (0,1 M, pH 7) foi adicionado, coberto com parafilm, incubado durante 1 h a 37 °C, e lavado três vezes com Tween 20 a 0,1 %. 100 µL por poço de uma diluição de 1:2000 do anticorpo anti-canina IgG de cabra peroxidase de rábano (H+L), HRP; Invitrogen) diluído em PBS (0,1 M, pH 7), foi adicionado, coberto com parafilm e incubado durante 1 h a 37 °C, e depois lavado três vezes com Tween 20 a 0,1 %. Finalmente, 100 µL de ABTS foi adicionado a cada poço no escuro, cobrindo a placa com folha de alumínio e colocando-a em agitação orbital a 100 rpm durante 25 min. A leitura foi feita num leitor ELISA (Bio-Tek/ELX808; Biotek) a um comprimento de onda de 405 nm, utilizando o software Gen5.

(<https://www.biotek.es/es/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>).

### Protocolo de validação “in-house”

O ponto de corte foi determinado usando um método previamente descrito (Frey *et al.*, 1998) e calculado usando a seguinte equação:

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

Onde  $\bar{X}$  é a média dos resultados obtidos de uma série de controlos negativos, SD é o desvio padrão dessa série de resultados, t é o percentil (1 -  $\alpha$ ) da distribuição t de um Estudante de uma cauda com (n - 1) graus de liberdade, e n é o número de controlos testados. Os resultados são considerados positivos para a infecção *B. canis* se estiverem acima do resultado deste cálculo. Em seguida, a precisão foi avaliada através do cálculo da precisão intermédia e da repetibilidade utilizando o material suplementar de um guia, (Andreasson *et al.*, 2015) onde o Coeficiente de Variação (%CV) é calculado a partir de uma série de medições independentes em dias diferentes (Precisão Intermédia), bem como de uma série de medições simultâneas (Repetibilidade). Além disso, a média e o desvio padrão destes parâmetros foram calculados, utilizando um controlo positivo e um controlo negativo. As repetições foram feitas em cinco dias diferentes, cinco vezes cada um. A robustez dos testes foi avaliada para soros positivos e negativos, variando por +/- 5 °C a temperatura de incubação dos soros de referência, usando 37 °C como temperatura de referência. Da mesma forma, o tempo de incubação foi variado em +/- 5 min em relação ao padrão; os resultados foram comparados utilizando uma ANOVA e as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey Honestly Significant Difference (HSD) (Andreasson *et al.*, 2015). A selectividade foi avaliada utilizando soros de cães positivos para doenças que não a Brucelose canina. Para avaliar a estabilidade da amostra, 19 alíquotas foram preparadas a partir de um controlo positivo e de um controlo negativo e foram submetidas a um processo de congelamento-degelo para comparação utilizando o seguinte protocolo: (Andreasson *et al.*, 2015).

1. As alíquotas 1 a 6 foram descongeladas à temperatura ambiente durante 2 h e depois recongeladas durante 12 h.
2. Os números 2 a 6 foram descongelados durante 2 h e recongelados durante 12 h.
3. Os números de 3 a 6 foram descongelados durante 2 h e recongelados durante 12 h.
4. Números 4 a 6 descongelados durante 2 h e recongelados durante 12 h.
5. Números 5 e 6 descongelados durante 2 h e recongelados durante 12 h.
6. A alíquota 6 foi descongelada durante 2 h e congelada de novo durante 12 h.

7. As amostras 7 a 12 foram mantidas à temperatura ambiente desde o início da avaliação; uma alíquota foi movida para o congelador após 1 h, uma segunda alíquota após 2 h, uma terceira alíquota após 4 h, uma quarta alíquota após 24 h, uma quinta alíquota após 72 h, e a sexta alíquota após 168 h.
8. As alíquotas de 13 a 18 foram mantidas a 4 °C desde o início da avaliação e foram movidas para o congelador utilizando o mesmo processo descrito no ponto 7 acima.
9. A alíquota 19 foi mantida a -20 °C e depois testada um mês mais tarde.

Finalmente, a sensibilidade e especificidade foram testadas usando 10 soros negativos e 10 positivos, ajustando os resultados de acordo com a fórmula previamente descrita para obter o Intervalo de Confiança de 95% (IC<sub>95%</sub>) (DasGupta *et al.*, 2001; Jacobson, 1998), usando o seguinte cálculo:

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

Construindo o intervalo de confiança como  $(A-B)/C$ ,  $(A+B)/C$ .

## RESULTADOS

### I-ELISA usando antígeno bruto sonicado

O ponto de corte a 0,98 DO foi calculado utilizando 10 controlos negativos. No teste de precisão, descobrimos que para o controlo negativo o CV foi de 3,7% para a repetibilidade e 13% para a precisão intermédia, com uma média de 0,5 DO; para o controlo positivo, o CV foi calculado como 1,1% para a repetibilidade e 3,8% para a precisão intermédia, com uma média de 3,0 DO.

Com respeito aos resultados da ANOVA para a robustez, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando a temperatura variou, contudo, o teste HSD de Tukey mostrou que a diferença foi entre os resultados da incubação do soro a 32 °C e 42 °C, e não entre qualquer um destes e a temperatura padrão de 37 °C; a ANOVA dos resultados dos testes com tempos de incubação variáveis mostrou diferenças significativas ( $p < 0,01$ ), que o teste Tukey HSD mostrou estar entre os tempos de incubação de 55 min e 65 min, bem como cada um destes tempos em comparação com o padrão de 60 min.

O teste de selectividade permitiu identificar um teste falso positivo utilizando soro de cães infectados com *L. interrogans*. O teste de estabilidade da amostra mostrou uma variação significativa na amostra negativa começando às 4 h a 25 °C, 24 h em refrigeração (4 °C), e o segundo ciclo de congelação-descongelação, mas não houve variação na amostra

que foi mantida congelada (-20 °C) durante 30 dias. Nas alíquotas de controlo positivo, não houve variação significativa durante todo o procedimento. O teste mostrou uma sensibilidade de 100% (CI<sub>95%</sub> 70 - 100%) e especificidade de 100% (CI<sub>95%</sub> 70 - 100%).

### **I-ELISA usando GroEL**

O ponto de corte foi calculado como 1,228 DO usando 10 controlos negativos. No teste de precisão, para o controlo negativo a %CV foi de 4,6% para a repetibilidade e 12,9% para a precisão intermédia, com uma média de 0,7 DO. Para o controlo positivo, a %CV foi calculada como 8,1% para a repetibilidade e 16,8% para a precisão intermédia, com uma média de 1,3 DO. A ANOVA para a robustez mostrou diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) quando a temperatura foi variada, que o teste Tukey HSD identificou estar entre os resultados dos soros incubados a 42 °C e a temperatura padrão (37 °C) e entre a incubação a 32 °C versus 42 °C. No que diz respeito aos testes em que o tempo de incubação foi variável, a ANOVA mostrou diferenças significativas nos resultados entre 55 e 60 min, 60 e 65 min, e 55 e 65 min de acordo com o teste Tukey HSD.

O teste de selectividade permitiu a identificação de um teste falso positivo de soro de cães infectados com *L. interrogans* e *Salmonella* spp. O teste de estabilidade da amostra mostrou que para os negativos, começaram a ocorrer diferenças significativas a 168 h a 25 °C, uma semana em refrigeração, e o segundo ciclo de congelação-descongelação, enquanto para os positivos, não houve diferenças, mesmo após 168 h a 25 °C, 24 h em refrigeração, e 7 ciclos de congelação-descongelação. Contudo, em ambos os casos houve uma curva com variações significativas durante as primeiras horas de armazenamento da amostra, tanto à temperatura ambiente como em refrigeração. Nem os positivos nem os negativos variavam quando as amostras eram armazenadas em estado congelado durante até um mês. O teste mostrou uma sensibilidade de 44 % (IC<sub>95%</sub> 18 - 73 %) e especificidade de 67 % (IC<sub>95%</sub> 35 - 88 %).

## **DISCUSSÃO**

A Brucelose canina é uma doença cujo risco epidemiológico potencial foi subestimado, (Hensel *et al.*, 2018; Hubbard *et al.*, 2018; Hull e Schumaker, 2018; Krueger *et al.*, 2014) resultando em pouco interesse de investigação. É portanto necessário desenvolver métodos de diagnóstico para que este problema possa ser abordado, e a este respeito os métodos serológicos desempenham um papel importante (Avijgan *et al.*, 2019). Neste estudo, dois antigénios diferentes de *B. canis* foram avaliados até aos seus limites em dois imunoenaios diferentes para estabelecer as condições de alcance sob as quais servem para detectar os anticorpos presentes numa amostra, e portanto, a sua validade como testes de diagnóstico, (Andreasson *et al.*, 2015) garantindo que podem ser aplicados no terreno.

O primeiro aspecto que deve ser determinado é o ponto de corte, uma vez que este é utilizado como referência para diferenciar entre amostras positivas e negativas durante o resto dos testes, bem como as variações nos resultados. O método utilizado baseia-se em cálculos probabilísticos, que tem sido preferido ao método empírico (Frey *et al.*, 1998), uma vez que oferece maior certeza na tomada de decisões sobre a positividade de uma amostra. Depois, foi feita uma avaliação da precisão com base no cálculo da repetibilidade e da precisão intermédia. Segundo a literatura, a precisão intermédia não deve exceder a repetibilidade duplicada, (Andreasson *et al.*, 2015) no entanto, esta regra pode ser modificada em função da natureza do método a ser validado. Por este motivo, a fim de considerar se a técnica é reprodutível, foi utilizada como pontos de referência uma precisão intermédia e uma repetibilidade %CV inferior a 20 % (Jacobson, 1998). Segundo este critério, tanto a CA - iELISA como a GroEL - iELISA demonstraram níveis aceitáveis de repetibilidade e precisão intermédia tanto para amostras positivas como negativas, sugerindo que os resultados podem ser confiados.

Ao avaliar a selectividade dos testes, verificou-se que o teste CA - iELISA mostrou uma reacção cruzada com cães infectados com *Leptospira* spp. No teste GroEL - iELISA, houve uma reacção cruzada adicional com *Salmonella* spp. A reacção cruzada com *Leptospira* spp. foi descrita anteriormente noutros métodos serológicos (Rosa Bengala) em bovinos vacinados contra esta espiroqueta, (de Faria Naves *et al.*, 2012), além disso, isto foi relatado em cães por comunicação pessoal (Moreno-Torres A, 2018). Além disso, na única literatura que aborda especificamente esta questão, não foi encontrada nenhuma reacção cruzada entre *B. canis* e *Leptospira* spp utilizando o teste RSAT (Krecic, 2019). Este estudo é portanto o primeiro a demonstrar uma reacção cruzada entre *B. canis* e *Leptospira* spp. Devido à natureza dos antígenos de captura utilizados como referência, e à ausência de reacções positivas aos mesmos num método baseado na detecção de antígenos de membrana, podemos inferir que os antígenos responsáveis pela interferência são de origem citosólica. Esta proteína chaperone é expressa abundantemente em biofilmes de *Leptospira* spp (Vinod Kumar *et al.*, 2017) o que sugere uma possível relação entre a formação destes biofilmes e a elevada exposição a GroEL que gera anticorpos contra estas moléculas, embora esta questão esteja para além do âmbito deste estudo. Além disso, verificou-se que GroEL de *Salmonella* spp é altamente homólogo a GroEL de *Escherichia coli*, e ambos são altamente homólogos a uma proteína presente em *Brucella* spp., (Panchanathan, 1998; Sekhavati *et al.*, 2015) o que poderia explicar a reacção cruzada no teste GroEL - iELISA com *Salmonella* spp. Para responder a esta pergunta, é necessário abordar o problema de uma perspectiva molecular ou bioinformática para determinar as semelhanças entre GroEL das duas espécies de bactérias. Existem outros agentes patogénicos que são conhecidos por causar reacções cruzadas com *Brucella* spp. (Mol *et al.*, 2020), essas possíveis interferências no diagnóstico devem ser estudadas no futuro para excluir reacções cruzadas. Um dos mais conhecidos é o caso de *Yersinia enterocolitica*, que interfere com



a detecção de *B. melitensis* e *B. abortus*; contudo, até à data não existem dados publicados que indiquem que este agente patogénico afecta diferentes testes serológicos de *B. canis*. Em vez disso, Hurvell, em 1972, demonstrou que os antígenos da *Yersinia enterocolitica* não reagem de forma cruzada com *Brucella rugosa*, nomeadamente *B. canis* e *B. ovis* (Hurvell, 1972).

Com base nos resultados dos testes de estabilidade, recomenda-se que as amostras para AB-iELISA sejam mantidas a 25 °C durante menos de quatro h, em refrigeração durante menos de 24 h, sendo a congelação o método preferido de armazenamento de amostras, uma vez que foram obtidos resultados fiáveis mesmo após um mês de congelação. Para o GroEL - iELISA, recomenda-se que as amostras não sejam deixadas mais do que uma h à temperatura ambiente ou em refrigeração e que sejam imediatamente colocadas num congelador para garantir que os resultados sejam fiáveis. A sensibilidade e especificidade calculadas para AB-iELISA são boas, mas o intervalo de confiança é demasiado frouxo devido ao número de amostras utilizadas, pelo que devem ser interpretadas com isto em mente. O mesmo se aplica ao GroEL - iELISA. Uma vez que para a validação "in house" dos testes serológicos, a determinação da sensibilidade e especificidade não é necessária de acordo com o método descrito por Andreasson (Andreasson *et al.*, 2015), neste trabalho não foi incluído um maior número de amostras; em vez disso, decidimos calcular estes parâmetros com o único objectivo de obter um ponto de comparação entre os testes que nos aproxima dos cenários possíveis quando o utilizamos na prática clínica diária. No trabalho futuro, deveriam ser analisadas mais amostras para permitir uma estimativa mais precisa dos parâmetros, a fim de utilizar alguns destes testes para estudos epidemiológicos. Uma vez que não era esse o objectivo deste estudo, não explorámos mais esta questão.

Finalmente, a comparação entre os testes apresentados neste estudo, reforça a ideia de que a utilização de diversos antígenos num teste de diagnóstico é preferível à utilização dum único antígeno (Wanke *et al.*, 2002). No entanto, a discussão sobre se os antígenos citosólicos são mais úteis no diagnóstico do que os antígenos de membrana permanece em aberto, uma vez que foi observado um melhor desempenho no teste que utilizou uma mistura de antígenos de ambas as origens do que no teste que utilizou apenas o antígeno citosólico.

A Brucelose canina é uma doença que requer mais atenção e investigação. Assim, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico com controlo de qualidade adequado permitirá investigações futuras que explorem mais profundamente o impacto desta doença na saúde humana e animal e nos levem a melhorar as estratégias de prevenção e controlo seguindo a filosofia One Health.

## CONCLUSÕES

Considerando os pontos acima, pode-se concluir que o AB - iELISA não só teve um melhor desempenho que o GroEL - iELISA, mas também que, dados os resultados obtidos, é um teste de diagnóstico útil para a Brucelose canina no campo. Uma vez que detecta não só antígenos de membrana externa, mas também antígenos citosólicos, o AB - iELISA é mais útil no diagnóstico do que os testes de imunoaglutinação. AB - iELISA também nos permite abordar a resposta imunológica do hospedeiro de forma semi-quantitativa (não apenas qualitativa), tornando-o potencialmente útil para o primeiro veterinário de contacto a monitorizar serologicamente o doente durante o tratamento.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Díaz-Aparicio Efrén por ter comentado amavelmente a versão final e ao Moreno-Torres Azaf pela comunicação pessoal sobre a reacção cruzada entre *Brucella* spp e *Leptospira* spp. Victor Palacios-Rodríguez recebeu uma bolsa do Sistema Nacional Mexicano de Investigadores (SNI), CONACYT.

## FINANCIAMENTO

This research work was financed by DGAPA-UNAM, PAPIIT project No. IT201017.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não declararam potenciais conflitos de interesse em relação à investigação, autoria, e/ou publicação deste artigo.

**Material Suplementar.** As figuras 1-4 mostram o processo de purificação de proteínas GroEL. A tabela 1 corresponde à identificação das proteínas por cromatografia líquida - espectrometria de massa.

## 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)