



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**“COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DE ELISA  
INDIRECTA, INMUNODIFUSIÓN DOBLE Y  
AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PLACA PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS CANINA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A :  
**ADRIANA MARCELA GONZÁLEZ GUERRERO**

Asesores:

Dr. Francisco Suárez Güemes

Dra. Erika Gabriela Palomares Resendiz



México, D. F.

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mi mamy María Elena Guerrero Espinosa, tú que me cantabas caminito de la escuela y quien siempre me enseña algo nuevo. Sin tí no hubiera podido lograr nada; gracias por tu gran apoyo, todo ese amor, regaños, tus deliciosas comidas, levantarme a diario y alentarme a ser mejor cada día. Espero ser tan fuerte como tú. Te adoro ♥

A mi padre Ángel González Díaz y al resto de mi familia por su apoyo, cariño y animo constante.

A Fabian Ramírez Arias, gracias por ser mi amigo y mi pareja al mismo tiempo, por aceptarme tal como soy, con todos mis animales y peculiaridades. McFly!

A todos mis maestros que han contribuido a mi formación tanto profesional como personal.

A mis amigos Mary, Roy's, Ely, Nayeli, Brenda, Ramiro, Toño... aunque nuestros caminos son distintos que el tiempo y la distancia no me separen de ustedes. Gracias por su cariño y darme la oportunidad de ser parte de sus vidas. A Rumina, colaboradora involuntaria, fue parte importante en este trabajo.

A todos los animalitos que me han acompañado a lo largo de este camino y me han permitido aprender de ellos; amados y respetados maestros sin título pero muy sabios. Mi Flaca hermosa que siempre me recibía con tanta alegría, compañera de involuntaria de prácticas que me acompañó largo tiempo; Peluzza, Roquefort, Romina, Mandy, Mofeta, Zarigüeya, Cucho...

A la memoria de mis abuelos y de Enrique Guerrero Espinosa, nos hacen mucha falta pero ya nos volveremos a ver...

## AGRADECIMIENTOS

*Cada niño debe aprender el universo de nuevo. Cada cachorro lleva el universo adentro. Los seres humanos han exteriorizado su sabiduría, la han almacenado en museos, bibliotecas, en el saber de los cultos. La sabiduría canina está dentro de la sangre y de los huesos.*  
Donald McCaig

Un enorme y especial agradecimiento a la Dra. Beatriz Arellano Reynoso por abrirme las puertas del laboratorio, su confianza, paciencia, por todas esas horas encerradas en el laboratorio de bioseguridad y la forma tan bonita en que me explica cosas que para mí son difíciles. Sin usted este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Gabriela Palomares Reséndiz, al Dr. Efrén Díaz Aparicio y al Dr. Francisco Suárez Güemes; personas de gran sabiduría. Gracias por transmitirme sus conocimientos, las atenciones para conmigo y su dedicación.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán por enseñarme a medir proteínas, porque nunca te niegas a resolverme una duda, los tips de trabajo y la amistad que me has brindado.

A Rodrigo "Roy's" Ávila Vázquez, porque cuando se me cerro una puerta tú me abriste otra. Gracias por tu amistad, todo el PBS, compañía y todo el conocimiento que me transmitiste.

A Cristina Ibarra, Aldo Aguilar, Anaid Maciel, Alejandra Cortes, Adrián Muñoz, Jorge Alva, Arelí y Omar Catalán; por hacer del laboratorio un lugar agradable, enseñarme a manejar el equipo y corregirme cuando fue necesario. Al Dr. Edgar Alfonseca Silva por prestarme material bibliográfico, sobre todo su tesis de maestría que fue de gran ayuda. A Pablito por enseñarme a elaborar medios, toda

la ayuda que me diste en este tiempo y las pláticas, ojalá hubiera un Pablito en todos los laboratorios.

Al resto del personal del INIFAP. Isabel Tuxpan y José Luis Gutiérrez por su colaboración a la elaboración de antígeno de AGID. A Blanca, Beto, Magda, Anita Fernández, Anita Cervantes, Tomas, Agustín, Erik y Pilar; me costó mucho trabajo adaptarme a un lugar nuevo de trabajo y ustedes lo hicieron más fácil.

A la Dra. Ma. Cristina Rodríguez Sánchez por asesorarme en la elaboración del antígeno para RSAT, facilitarme artículos y su tesis para respaldar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la hermosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, porque en ella he reído, llorado, tropezado una y otra vez, conocí infinidad de personas muy valiosas, la formación académica que he recibido dentro de ella y la que me falta... I'll be back.

A los miembros del jurado el Dr. Francisco Aguilar Romero, la Dra. Alejandra Mercadillo Sierra y el Dr. Carlos Gerardo Salas Garrido.

Agradezco el financiamiento y la beca brindada por el proyecto Nuevas estrategias de diagnóstico para la brucelosis canina, PAPIIT IT202214.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y en el Departamento de Enfermedades de los pequeños rumiantes del CENID-Microbiología del INIFAP-SAGARPA.

**CONTENIDO**

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> . . . . .	<b>4</b>
1.1 ETIOLOGÍA . . . . .	<b>5</b>
1.2 TRANSMISIÓN . . . . .	<b>6</b>
1.3 PATOGENIA . . . . .	<b>7</b>
1.4 SIGNOLOGÍA . . . . .	<b>8</b>
1.5 DIAGNÓSTICO . . . . .	<b>10</b>
1.6 TRATAMIENTO . . . . .	<b>14</b>
1.7 PREVENCIÓN Y CONTROL . . . . .	<b>15</b>
1.8 SALUD PÚBLICA . . . . .	<b>17</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.</b> . . . . .	<b>18</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> . . . . .	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> . . . . .	<b>19</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> . . . . .	<b>20</b>
<b>6. RESULTADOS</b> . . . . .	<b>38</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b> . . . . .	<b>43</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> . . . . .	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> . . . . .	<b>48</b>
<b>APÉNDICE:</b> Preparación de medios, reactivos y soluciones . . . . .	<b>54</b>

## RESUMEN

GONZÁLEZ GUERRERO ADRIANA MARCELA. Comparación de las pruebas de ELISA Indirecta, Inmunodifusión doble y Aglutinación rápida en placa para el diagnóstico de brucelosis canina (bajo la dirección de: Dr. Francisco Suárez Güemes y Dra. Erika Gabriela Palomares Resendiz).

La brucelosis canina es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Brucella canis*, especie rugosa del género *Brucella*. Esta enfermedad se caracteriza por provocar epididimitis, orquitis, fibrosis testicular y abortos.

El diagnóstico definitivo es el aislamiento de *B. canis*; sin embargo, existen pruebas serológicas consideradas de tamiz, tales como la aglutinación rápida en placa, inmunodifusión doble y la ELISA-Indirecta. De éstas solo la aglutinación rápida en placa es la que actualmente se ofrece en los laboratorios de diagnóstico en nuestro país.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una ELISA-Indirecta (ELISA-I) y compararla con las pruebas de aglutinación rápida en placa (RSAT) e inmunodifusión doble en agar (AGID). La prueba que mostró mayor sensibilidad para detectar los anticuerpos de los animales infectados fue la ELISA-Indirecta (100%), seguido de aglutinación rápida en placa (86.4%) y finalmente inmunodifusión doble (70.4%). En cuanto a especificidad las tres pruebas mostraron tener un 100%.

**Palabras clave:** *B. canis*, brucelosis canina, diagnóstico serológico, ELISA-Indirecta.



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

2βME	2β-mercaptoetanol
(M-)	Mucoide negativo
°C	Grados centígrados
μg	Microgramos
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
-	Negativo
+	Positivo
ABTS	3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AGID	Inmunodifusión doble en gel agar
atm	Atmósferas
BSA	Albúmina sérica bovina
BL	Blanco
C-	Control negativo
C+	Control positivo
cc	Centímetros cúbicos
DO	Densidad óptica
DE	Desviación estándar
ELISA-I	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto
g	Gramos

h	Hora
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
min	Minutos
mg	Microgramos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normalidad
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20
pH	Potencial de iones de hidrogeno
PVC	Paquete de volumen celular
RSAT	Prueba de aglutinación rápida en placa
SSF	Solución salina fisiológica
TSA	Agar tripticasa soya
V/V	Volumen/Volumen
xg	Gravedades

## 1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad bacteriana infectocontagiosa de curso agudo o crónico, causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta a varias especies de animales domésticos, silvestres e inclusive al humano; dicha infección causa, principalmente, anomalías reproductivas. <sup>(1)</sup>

Hoy en día, dentro del género *Brucella* se reconocen 10 especies que se clasifican por la naturaleza del Lipopolisacárido (LPS) en especies de fenotipo liso y rugoso, grado de patogenicidad y por su hospedero preferente, aunque la mayoría de las especies pueden afectar a más de una especie animal. Las especies de fenotipo liso tienen el LPS completo y son: *B. abortus* que afecta principalmente a bovinos, *B. suis* a cerdos, *B. melitensis* a caprinos, *B. neotomae* a la rata del desierto, *B. pinnipedialis* a pinnípedos (lobos y leones marinos, focas, elefantes marinos y morsas), *B. ceti* a cetáceos (ballenas, delfines y orcas), *B. microti* al ratón de montaña y *B. inopinata* que fue aislada en 2010 de una infección de un implante mamario. Mientras que las especies con LPS de fenotipo rugoso por carecer de la cadena O; únicamente son *B. ovis* que afecta a ovinos y *B. canis* a perros. <sup>(2, 3)</sup>

En nuestro país los laboratorios certificados que ofrecen el diagnóstico de la brucelosis canina son la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y en el CENID-Microbiología del INIFAP (SAGARPA), donde se realizan RSAT y el aislamiento bacteriológico. La falta de antígenos comerciales y de estandarización de las pruebas limita la disponibilidad del diagnóstico en laboratorios veterinarios. La cepa de *B. canis* con la que se elabora el antígeno es de la cepa Mucoide

negativo (M-) RM6/66, que tiene la desventaja de perder su característica fenotípica rápidamente si no se cultiva con extremo cuidado, revirtiendo en una cepa mucoide que hace difícil la elaboración del antígeno ya que inclusive puede autoaglutinar, lo cual disminuye la sensibilidad de la prueba y aumenta la probabilidad de dar un resultado falso positivo. Esto aunado a la poca disponibilidad de semilla maestra para la elaboración del antígeno.<sup>(4)</sup>

Por poner un ejemplo, el laboratorio de diagnóstico bacteriológico de la FMVZ-UNAM recibió 520 casos en el lapso de enero de 2009 y hasta agosto de 2013, con un promedio de 104 casos por año. Desafortunadamente, el laboratorio de diagnóstico bacteriológico ha elaborado recientemente su último lote de antígeno, debido a que su semilla de la cepa *B. canis* (M-), originalmente donada por Dr. Leland Carmichael está por terminarse, lo cual hace necesario la implementación de pruebas diagnósticas diferentes o bien la utilización de otras cepas diferentes de la RM6/66 (M-).<sup>(5)</sup>

## 1.1 ETIOLOGÍA

*Brucella canis* es un cocobacilo Gram negativo, que mide 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  de ancho por 0.6-1.5  $\mu\text{m}$  de largo; se presentan individualmente o escasamente en pares, cadenas cortas o en pequeños racimos al observarlas en un frotis. Son carentes de cápsula, flagelos, no forma esporas y su metabolismo es aerobio. Es una bacteria intracelular facultativa.<sup>(1)</sup>

## 1.2 TRANSMISIÓN

La forma más común de transmisión es por la vía oral. La menos frecuente, pero posible es la vía genital, contacto con líquido seminal o descargas vaginales de animales infectados y mediante el coito <sup>(6)</sup>.

La bacteria también puede ser contagiada por la vía conjuntival o por contacto de cualquier membrana mucosa con fluidos vaginales de hembras infectadas durante el estro, parto o después del aborto donde se han encontrado concentraciones bacterianas de más de  $10^{10}$  UFC/ml. Se ha demostrado que la dosis infectiva oral mínima en perros es de  $10^6$ , y la conjuntival de  $10^4$ . <sup>(7)</sup>

El líquido seminal es una fuente de infección muy importante, ya que la infección en los perros machos se aloja en la próstata y el epidídimo, principalmente <sup>(7)</sup>. En la orina se llega a excretar una cantidad de  $10^3$ - $10^6$  bacterias/ml, esta vía de eliminación es la más importante ya que *B. canis* permanece en la próstata y la orina arrastra las bacterias, con la consecuente dispersión al medioambiente <sup>(1)</sup>. A pesar de que en leche se libera una gran cantidad de bacterias, se considera que no es significativa durante la infección debido a que las crías se infectan dentro del útero o al momento de pasar por el canal de parto.

Se han aislado pequeñas cantidades de *B. canis* en saliva, heces, secreciones nasales y oculares; por lo que se consideran de poca importancia como fuente de infección. <sup>(8)</sup>

### 1.3 PATOGENIA

Las *Brucella* spp. puede atravesar las membranas mucosas donde son fagocitadas por macrófagos y otras células fagocíticas, las cuales las transportan a los nódulos linfáticos regionales. Si la infección se dió por vía oral o conjuntival, las bacterias se dirigen a los nódulos retrofaríngeos, si fue por vía genital irán a los nódulos iliacos e inguinales. Una vez en los linfonodos las bacterias se multiplicarán causando inflamación. Dado que la *Brucella* spp. se ubica intracelularmente el sistema inmune no puede eliminarla, confiriéndole resistencia a la terapia convencional con antimicrobianos.<sup>(8)</sup>

La respuesta inmune se desarrolla en los siguientes 4 a 7 días postinfección, con la aparición de anticuerpos IgG e IgM<sup>(1)</sup>.

Entre la primera y la sexta semana postinfección se presenta la bacteremia que puede persistir de seis hasta 64 meses, esto permite la diseminación de la bacteria a otros tejidos como hígado, linfonodos, bazo, útero, glándula mamaria, testículos, próstata y medula ósea.<sup>(8-10)</sup>

La afinidad de la bacteria por la placenta y los fetos, en particular los trofoblastos corioalantoicos, está correlacionado con la presencia de eritritol. Este azúcar promueve el crecimiento de la *Brucella* spp *in vitro*. La proliferación de la bacteria en los trofoblastos lleva a la placentitis, la infección del feto y al aborto, que caracteriza a la brucelosis animal<sup>(11, 12)</sup>.

## 1.4 SIGNOLOGÍA

La mayor parte de los perros infectados permanecen asintomáticos. Los hallazgos a la exploración clínica en perros con una infección temprana o en hembras que no están gestantes son inespecíficos en la mayoría de los casos, comprenden fiebre intermitente, adenopatías periféricas, aletargamiento, pérdida de peso y ligera esplenomegalia. El problema clínico más frecuente son las alteraciones reproductivas. <sup>(8, 10)</sup>

Los abortos suelen producirse entre los 45 y 55 días de gestación, seguidos de un flujo vaginal pardo o gris verdoso persistente. La fertilidad se reduce, puede haber aparentes fallos de concepción o muerte fetal precoz 30 a 35 días después del apareamiento. Si la gestación llega a término se puede ver una camada con cachorros vivos y muertos o disminución en el tamaño de camada. Los cachorros que nacen vivos generalmente mueren en el transcurso de horas o días; los individuos que sobreviven, al llegar a la madurez sexual presentan linfadenomegalia generalizada como manifestación clínica de la enfermedad <sup>(10, 13)</sup>.

Los fetos abortados se observan parcialmente autolisados y presentan lesiones características de una infección bacteriana generalizada, tales como edema subcutáneo, congestión y hemorragia en la región abdominal subcutánea; fluido peritoneal sero-sanguinolento con infiltración focal de células linfoides y lesiones degenerativas en hígado, bazo, riñones e intestino <sup>(8)</sup>.

Los machos infectados durante los primeros tres meses suelen presentar orquitis, epididimitis, prostatitis y dermatitis escrotal favorecida por la constante lamedura.

La infección crónica se asocia con atrofia testicular unilateral o bilateral <sup>(1, 13)</sup>. Al examen microscópico del eyaculado se observa azoospermia y aglutinación de los espermatozoides <sup>(8)</sup>.

La infertilidad en los machos se debe a la proliferación de *B. canis* en el epidídimo, a la fagocitosis de espermatozoides y a la fuga extravascular de espermatozoides fagocitados, que hacen que se formen anticuerpos anti-espermatozoides <sup>(10)</sup>.

Los signos no reproductivos relacionados con la infección de *B. canis* son discoespondilitis, artritis, osteomielitis, meningitis, encefalitis focal no supurativa y uveítis <sup>(6)</sup>.



## 1.5 DIAGNÓSTICO

La enfermedad es difícil de diagnosticar debido a que los animales infectados frecuentemente parecen clínicamente sanos ocasionando así daño en los criaderos; como consecuencia, la enfermedad se puede diseminar rápidamente antes de ser detectada, representando un riesgo sanitario tanto para los criadores como para los propietarios de animales de compañía <sup>(14)</sup>.

La epididimitis, la atrofia testicular, la dermatitis escrotal, la baja calidad del semen y ocasionalmente la esterilidad son signos importantes para concretar el diagnóstico. También es importante considerar aquellos casos de discoespondilitis y de uveítis como una probable brucelosis. No hay cambios característicos en la hematología, pero en el semen de los machos infectados se pueden presentar anomalías entre las 5 y 8 semanas postinfección <sup>(1)</sup>.

### **Diagnóstico bacteriológico**

El único método que permite establecer un diagnóstico definitivo es el aislamiento y la identificación de las bacterias. *B. canis* se puede aislar de exudado vaginal, fetos abortados, placenta, leche, orina y semen; pero la sangre es la muestra bacteriológica por excelencia ya que los perros infectados padecen bacteremias largas. Lamentablemente el hemocultivo estará condicionado a la presencia de bacteremia. El aislamiento bacteriológico es la prueba contundente para dictaminar un diagnóstico definitivo; sin embargo, tiene varias desventajas, una de ellas es que la bacteremia no es constante y su duración es variable, lo que hace

necesario hacer hemocultivos repetidos y aun así puede haber casos con falsos negativos. El resultado puede tardar de 72 horas hasta nueve días y se requieren condiciones de seguridad, equipo, medios de cultivo adecuado y personal capacitado. Por lo que se hace necesario combinar el diagnóstico bacteriológico con el serológico <sup>(15)</sup>.

### **Diagnóstico serológico**

Se emplean varios métodos serológicos para el diagnóstico de la brucelosis canina; sin embargo, éstos son poco sensibles durante las primeras cuatro semanas de infección, después los perros mantienen una respuesta alta de anticuerpos contra los antígenos proteicos y el LPS <sup>(1)</sup>.

- **Aglutinación rápida en placa con 2β-mercaptoetanol (RSAT con 2βME)**

La prueba de aglutinación rápida en placa con 2βME detecta anticuerpos anti-*Brucella* en sueros animales. En la reacción intervienen anticuerpos aglutinantes de las clases IgG e IgM. El 2βME rompe los puentes de disulfuro que unen a la IgM, la cual, es una molécula pentámerica que se encuentra en el suero como una respuesta temprana; el tratar los sueros con 2βME antes de agregar el antígeno, aumenta la especificidad y no reduce la sensibilidad. En el caso de la brucelosis canina el antígeno consta de una suspensión de *B. canis* cepa RM6/66 inactivada por calor, teñida con Rosa de Bengala, concentrado al 6% y

resuspendida en una solución tampón que tiene pH alcalino de 8.6 que impide la aglutinación inespecífica de las bacterias, contribuyendo así a la especificidad de la prueba. La clasificación de la reacción es positiva o negativa según la presencia o ausencia de aglutinación <sup>(16, 17)</sup>.

- **Inmunodifusión doble en gel agar (AGID)**

En la prueba de inmunodifusión doble, se da la migración por difusión en un soporte de gel de agarosa al 0.8% del antígeno como los anticuerpos, de modo que al encontrarse en proporciones óptimas, interaccionan produciendo una banda de precipitado visible. Esta prueba se utiliza principalmente para el diagnóstico de brucelosis ovina, donde se emplea un extracto salino caliente de *B. ovis* la cual es una cepa rugosa; aunque ésta sea una buena prueba para diagnosticar la brucelosis ovina, la sensibilidad y especificidad es variable para la brucelosis canina. Como una alternativa, en algunos países se utiliza con un antígeno rugoso salino con cepas de *B. canis*.<sup>(1, 18)</sup>

- **ELISA-Indirecta (ELISA-I)**

La aplicación de la Prueba de Enzima Ligada al Sustrato (ELISA) es de utilidad para la detección de animales infectados con *B. canis*. El método de la ELISA tiene como base la reacción de los anticuerpos contenidos en el suero sanguíneo con el antígeno unido a la superficie del inmunoabsorbente. Específicamente en la ELISA Indirecta (ELISA-I) se identifican los anticuerpos contra un antígeno conocido, empleando una segunda reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) con una anti-inmunoglobulina conjugada con una enzima peroxidasa que se unen a la unión del antígeno-anticuerpo, posteriormente se agrega un sustrato que es utilizado por la enzima, lo que provoca coloración, que es cuantificada mediante la lectura con un espectrofotómetro <sup>(15)</sup>.

## 1.6 TRATAMIENTO

Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz debido a la localización intracelular de *B. canis*, los antibióticos no pueden actuar de forma efectiva. Varios antimicrobianos han sido probados solos o en sinergia y ninguno ha logrado ser 100% eficaz, sin embargo, siempre se recomienda utilizar dos antimicrobianos que logren controlar la bacteremia <sup>(8)</sup>.

El mejor tratamiento inicial es la enrofloxacin a una dosis de 10-15 mg/kg por vía oral, cada 12 h durante tres semanas, después de este periodo el tratamiento se suspende tres semanas; y se repite hasta tres veces más, aunado a la aplicación de minociclina a dosis de 12.5 mg/kg vía oral, cada 12 h durante 14 a 21 días <sup>(10)</sup>.

Otra alternativa es la administración de tetraciclina a dosis de 30 mg/kg por vía oral durante 28 días y estreptomicina a dosis de 20 mg/kg intravenosa durante 14 días <sup>(8)</sup>.

Además de la terapia antimicrobiana se recomienda castrar a los animales para evitar las descargas vaginales y la presencia de bacterias en el semen e impedir que continúen diseminando el microorganismo. Los machos castrados siguen eliminando la bacteria, ya que ésta permanece en la próstata y es arrastrada por la orina <sup>(10)</sup>.

Los cultivos y las pruebas serológicas deben repetirse dos meses después del tratamiento <sup>(10)</sup>.

## 1.7 PREVENCIÓN Y CONTROL

Aunque no se han descrito las reglas exactas para prevenir el contagio de esta enfermedad, se deben establecer medidas de bioseguridad para evitar que entre en los criaderos.

Si aún no se ha presentado el brote <sup>(10)</sup>:

- a. No existe una vacuna disponible, la prevención de la enfermedad radica en evitar la exposición a la bacteria.
- b. Monitorear constantemente mediante pruebas serológicas.
- c. Los criadores solo deben cruzar sus perros con animales probados negativos a *B. canis*.
- d. Una vez confirmada la infección en un individuo o dentro de un criadero, se debe sacrificar a los animales con hemocultivo positivo.
- e. Cuarentenar a los perros nuevos y mantenerlos aislados hasta comprobar la negatividad de dos pruebas serológicas con un mes de diferencia.
- f. Remover la materia orgánica y desinfectar frecuentemente. **Tabla 1** <sup>(19)</sup>.

Si ya se ha presentado el brote de brucelosis canina:

- a. Eliminar a todos los animales infectados del programa de cría, y prioritariamente del criadero.
- b. Los productos del aborto deben ser incinerados o enterrados a una profundidad mínima de 1.5 metros y cubiertos con una capa de cal.
- c. Remover la materia orgánica y desinfectar frecuentemente. **Tabla 1** <sup>(19)</sup>.

- d. Si se trata de mascotas, deben ser castrados y advertir a los propietarios del incierto resultado del tratamiento, las consecuencias de mantener animales infectados y su potencial zoonótico <sup>(10)</sup>.

<b>Desinfectante</b>	<b>Concentración de la solución</b>	<b>Temperatura de la solución</b>	<b>Tiempo de exposición</b>
Solución de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio	2.5%	20°C	1 h
Solución de sosa caustica	2%	70-80°C	3 h
Suspensión de cal recién apagada	15%	Ambiente	1 h
Emulsión de creolina	5%	60-70°C	1 h
Solución de fenol	1%	37°C	15 min

**Tabla 1.** Desinfectantes recomendados para eliminar a la *Brucella* spp y su forma de aplicación. (Tomada de la NOM-041-ZOO-1995)

## 1.8 SALUD PÚBLICA

Esta enfermedad es considerada una zoonosis de tipo ocupacional para las personas que laboran en criaderos, los médicos veterinarios y el personal de los laboratorios de diagnóstico; sin embargo, también se presenta en propietarios que tienen un estrecho contacto con las mascotas infectadas. La brucelosis canina se ha reportado en Argentina, México, España, China, Túnez y otros países <sup>(8)</sup>.

Aunque es reconocido que *B. canis* es un agente que infecta perros y seres humanos, la información disponible sobre su prevalencia es limitada <sup>(20)</sup>. En México se realizó un estudio en pacientes hospitalizados con síntomas compatibles con la brucelosis a los que se les practicó RSAT, finalmente reveló una prevalencia de 13% de los títulos de anticuerpos <sup>(21)</sup>.

La rutina de diagnóstico de la brucelosis no incluye *B. canis*, por lo que la infección por esta especie puede ser más extensa de lo que se sospecha actualmente. La técnica serológica más utilizada para la detección de anticuerpos para *B. canis* en los seres humanos es la prueba de aglutinación rápida en placa <sup>(20)</sup>.

En general se acepta que la evidencia disponible sugiere una baja incidencia de brucelosis humana clínica y subclínica, debido a *B. canis* <sup>(20)</sup>.



## 2. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la prueba de aglutinación rápida en placa es la más utilizada para el diagnóstico de brucelosis canina. Para la elaboración del antígeno para RSAT lo más común es utilizar la cepa de referencia de *B. canis* RM6/66 M-, la cual ha probado tener una sensibilidad de 60% y especificidad de 100% <sup>(22)</sup>. También se pueden utilizar otras cepas mucoides, los cuales son elaborados en soluciones tampón con pH superior a 8 que tratan de evitar su autoaglutinación.

Por otro lado la desventaja de utilizar la cepa de referencia *B. canis* RM6/66 M-, es la posibilidad de que revierta a mucoide por los motivos antes expuestos. Por lo tanto, es necesario probar otras alternativas diagnósticas tales como la ELISA-I y la AGID con mayor sensibilidad y especificidad permitiendo una mayor certeza para el diagnóstico.

## 3. HIPÓTESIS

Las pruebas de ELISA-I e inmunodifusión doble tienen sensibilidad y especificidad igual o mayor a la prueba de aglutinación en placa que actualmente se utiliza para el diagnóstico de *B. canis*.

## 4. OBJETIVOS

### a. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una ELISA-Indirecta y compararla con las pruebas de inmunodifusión doble y la prueba de aglutinación rápida en placa con la finalidad de establecer otros métodos diagnósticos para la brucelosis canina.

### b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la obtención de antígenos para las pruebas de ELISA-Indirecta, inmunodifusión doble y la prueba de aglutinación en placa; a partir de una cepa RM6/66 (M-) de *B. canis*.
2. Estandarizar la ELISA-I a partir de un antígeno crudo sonicado de *B. canis*.
3. Determinación de la sensibilidad y especificidad de ELISA-I, AGID y RSAT con 2βME con sueros de animales infectados y animales sanos.
4. Detallar los procedimientos y protocolos para la obtención de los antígenos y los procedimientos para realizar las pruebas.
5. Comparar la sensibilidad y especificidad de las tres pruebas.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### Sueros de perros

Se utilizaron 19 sueros positivos y 17 sueros negativos procedentes de un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, como criterio de selección para el grupo de sueros positivos se consideraron que hayan tenido aislamiento bacteriológico positivo y diagnóstico serológico positivo mediante RSAT. Para seleccionar el grupo de sueros negativos se consideró que fueran animales clínicamente sanos (sin signos clínicos sugerentes a brucelosis canina; tales como problemas reproductivos, fiebre, linfadenopatía, etc), diagnóstico bacteriológico negativo y diagnóstico serológico negativo mediante RSAT.

### Cultivo de *B. canis*

Se utilizó la cepa de referencia RM6/66 (M-), realizándose el mismo protocolo de cultivo para la obtención de los tres antígenos <sup>(16)</sup>. El cultivo se hizo de acuerdo con lo descrito por el Dr. Carmichael y colaboradores <sup>(23)</sup>.

Se sembró con la técnica de aislamiento en cultivo puro *B. canis* RM6/66 (M-) en agar sangre y se incubó a 37°C por 48 h. Antes de iniciar la recolección se hizo un frotis con la tinción de Gram para corroborar la pureza.

Se recolectaron todas las colonias de la placa de agar, y se resuspendieron en 5 ml de SSF (pH 7.4) y fueron homogenizadas hasta obtener una suspensión.

Se inocularon tubos con TSA<sup>I</sup> inclinado con cinco gotas de la suspensión bacteriana cubriendo totalmente la superficie del agar e incubadas a 37°C por 48 h. Es recomendable sembrar tubos extra para descartar los que reviertan a mucoides.

Se vertieron lentamente 5 ml de SSF en cada tubo con TSA y con un hisopo se frotó suavemente la superficie del agar. Se colectó la suspensión de bacterias y se transfirió a un tubo estéril para cosechar las células.

### **Siembra en las botellas de Roux o Blake**

Se prepararon las botellas de Roux y Blake<sup>II</sup> con 100 ml de agar TSA duro (ver apéndice) que se dejó solidificar a temperatura ambiente toda la noche para que después se secan durante un día a 37°C. Las botellas se destaparon cuidadosamente con el agar hacia arriba para agregar lentamente por un costado 80 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro, previamente esterilizadas, sin que éstas tocan el agar ya que pueden formar surcos. Se agregaron 2.5 ml de la suspensión bacteriana obtenida de los tubos con TSA sobre las perlas de vidrio para que con ayuda de éstas, las bacterias se esparcieran sobre la superficie del agar. Las botellas inoculadas se volvieron a colocar con el agar hacia arriba y se incubaron a 37°C por 48 h. Las perlas de vidrio permanecieron en la parte ventral de la botella.

---

<sup>I</sup> MCD®

<sup>II</sup> Pyrex®

### **Producción de *B. canis***

El crecimiento de *B. canis* se realizó en el laboratorio de bioseguridad clase III del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

Se hicieron tres lavados agregando 5 ml de PBS en las botellas de Roux o Blake deslizando las perlas de vidrio sobre la superficie del agar para suspender y recolectar las bacterias en tubos de centrifuga de 50 ml (manteniendo la cosecha de cada botella por separado). Los lavados se repitieron tres veces para coleccionar la mayor cantidad posible de bacterias.

Las perlas de vidrio se recuperaron en un embudo cubierto con gasa estéril. Todo el material utilizado durante el proceso fue sumergido primeramente en hipoclorito de sodio al 2% y posteriormente esterilizado (120°C/15 atm/15 min).

Los tubos con la suspensión colectada fueron centrifugados a 1700 xg durante 20 min a 4°C, se retiró el sobrenadante, la pastilla para el antígeno de ELISA-I y RSAT se suspendió en PBS, mientras que la pastilla para el antígeno de AGID se suspendió en SSF. Se realizaron 2 lavados con PBS o SSF y se centrifugaron a 1700 xg durante 20 min a 4°C.

Posteriormente se inactivaron las bacterias destinadas a la producción del antígeno para ELISA-I y RSAT en baño María a 90°C durante 1 h, lo cual se corroboró sembrando 15 µl de cada tubo en placas de TSA e incubando a 37°C durante 48 h. La cosecha para el Ag de AGID se inactivó por medio de vapor fluente en autoclave a 100°C durante 20 min.

## RSAT

- **Elaboración del Antígeno para RSAT**

Un factor importante durante la producción del antígeno es la verificación en cada pase que se le da a *B. canis* RM6/66 (M-) de que no revierta a mucoide positivo.

El criterio para evaluar si se tornó mucoide es el que se describe a continuación:

En el cultivo que estaba en agar debía apreciarse una capa uniforme de bacterias, no debían haber colonias aisladas ni de aspecto brillante, entonces se determinaba que seguía siendo M-.

Si el cultivo se encontraba en caldo, la bacteria debió crecer en una suspensión homogénea. Por el contrario, si la cepa se ha tornado mucoide el cultivo crecía con grumos o se autoaglutinaba formando grandes hebras. Se centrifugó el caldo con cultivo a 1700 xg, la pastilla se disolvió con ayuda del vortex. Si las bacterias se resuspendían homogéneamente y sin formar hebras se determinaba que seguían siendo M-<sup>(16)</sup>.

El crecimiento de cada botella se mantuvo por separado hasta cerciorarse que las bacterias conservaban su característica M-, posterior a esto, todas las bacterias se juntaron en un solo vial.

Se ajustó el paquete de volumen celular (PVC) al 6% por medio de la técnica de microhematocrito. Se tomó una muestra de la suspensión con un tubo capilar llenándolo al 75% de su capacidad y se selló con plastilina epóxica<sup>III</sup> en un

---

<sup>III</sup> Plastiloka™

extremo. Se centrifugó a 10 000  $xg$  durante 5 min en una centrífuga para microhematocrito<sup>IV</sup>. El PVC se calculó multiplicando la longitud del paquete celular por 100 y el resultado se divide entre la longitud del paquete celular y el sobrenadante <sup>(4)</sup>.

Para lograr la concentración celular del 6% se aplicó la siguiente fórmula:

$$Vf = \frac{\%PVCi \times Vi}{PVC}$$

Donde  $Vf$  es el volumen final de sobrenadante,  $\%PVCi$  es el porcentaje de PVC inicial,  $Vi$  es el volumen inicial y  $PVC$  es el porcentaje de PVC deseado <sup>(24)</sup>.

Posteriormente se centrifugó a 1700  $xg$  y se suspendió en el volumen que se obtuvo aplicando la fórmula arriba mencionada. Se corroboró por la técnica de microhematocrito que el PVC se encontraba cercano a 6% (entre 6 y 6.9% es adecuado) <sup>(16)</sup>.

Se tiñó el antígeno, agregando 5 cc de Rosa de Bengala<sup>V</sup> estéril al 1% por cada 100 ml de antígeno concentrado al 6% y se colocó en agitación toda la noche a 4°C <sup>(4)</sup>.

Se realizaron varios lavados con PBS para retirar el exceso de colorante, hasta que el sobrenadante resultó cristalino, los dos últimos lavados fueron con Buffer de Tris-Maleato 0.4 M pH 8.6 y se re suspendió usando nuevamente Buffer de Tris-Maleato 0.4 M. Se verificó el PVC ya que tras la tinción las células tienden a

---

<sup>IV</sup> Damon® IE MB CENTRIFUGE

<sup>V</sup> Sigma®

deshidratarse, siendo necesario el reajuste del PVC teniendo como rango óptimo del 6 al 6.9% <sup>(16)</sup>. Se cuantificó la concentración proteica mediante la técnica de Bradford.

Finalmente el antígeno se fraccionó en viales de 5 ml, se identificó y almacenó en refrigeración a 4°C.

- **Realización de la prueba**

Sobre los círculos de la tarjeta visualizadora, o bien en una placa de vidrio cuadrículada se colocaron 30 µl de cada suero, se mezclaron con 30 µl de 2βME<sup>VI</sup> 0.02 M y se dejó incubar por 2 min. Después se añadió una gota de 30 µl del antígeno teñido con rosa de bengala depositándola junto a la mezcla anterior. Se mezcló con un palillo desechable, abarcando la superficie del círculo. Se movió realizando ligeros movimientos circulares de la placa de vidrio o la tarjeta por unos segundos y se observó al microscopio invertido en el objetivo de 10x.

La reacción negativa es aquella en la que se apreció una capa uniforme de células(ver **Figura 1**); mientras que la reacción positiva es aquella que manifestó aglutinación débil o intensa (ver **Figura 2**) <sup>(17)</sup>.

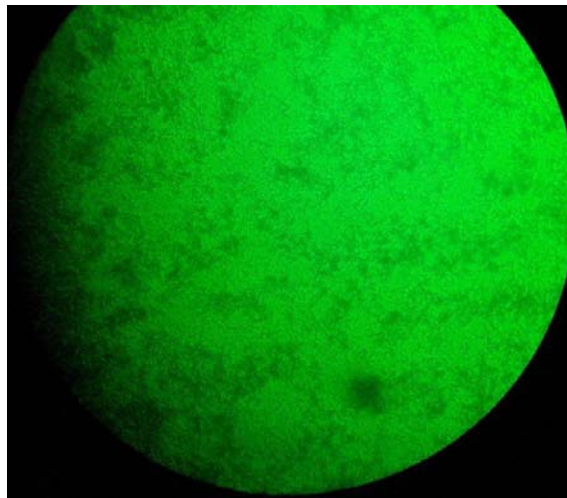
---

<sup>VI</sup> Sigma®





**Figura 1.** La reacción negativa de la prueba de RSAT es aquella en la que se aprecia una capa uniforme de células.



**Figura 2.** La reacción positiva de la prueba de RSAT es aquella que manifiesta aglutinación débil o intensa.

## AGID

- **Elaboración del Antígeno Salino Caliente de *B. canis* para AGID**

Se realizó con las células resuspendidas en SSF con un PVC de 6%. Posterior a la inactivación se dejó enfriar para centrifugar a 15 000 *xg* durante 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante se dializó en una membrana MWCO 12 000 a 14 000<sup>vii</sup> en agua destilada, usando 100 veces el volumen de la suspensión a 4°C y se recambio el agua 3 veces durante 3 días. Tras la diálisis se eliminó el precipitado que apareció en la membrana por medio de centrifugación a 15 000 *xg* <sup>(25)</sup>. Se cuantificó la concentración proteica mediante la técnica de Bradford.

Finalmente el antígeno se fraccionó en viales de 5 ml, se identificó y almacenó en refrigeración a 4°C.

---

<sup>vii</sup> Spectra/Por® Dialysis Tubing

○ **Realización de la prueba**

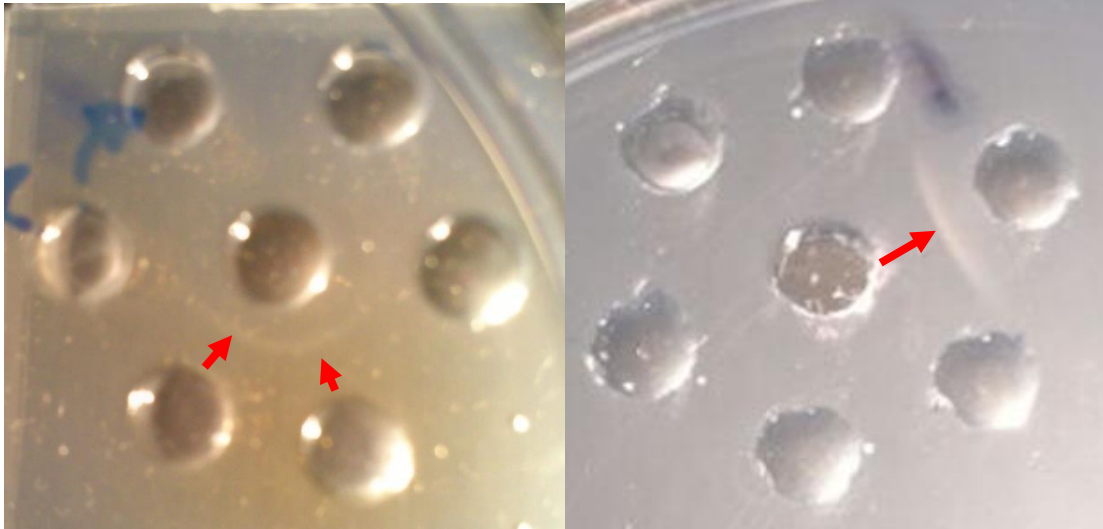
Se prepararon geles de agarosa<sup>viii</sup> al 0.8% en cajas de Petri de 3 a 4 mm de espesor con solución amortiguadora de Borato 30 mM (pH 8.3) y 11% de NaCl<sup>ix</sup>, y se realizaron perforaciones de 3 mm de diámetro y a 3 mm de separación entre ellos y dispuestos según un patrón hexagonal alrededor de un pozo central. Después se colocó en el pozo central 15 µl de antígeno rugoso salino de *B. canis*, 15 µl de los sueros problema en 5 de los pozos de la periferia y en el pozo restante 15 µl del suero control positivo. Se incubó el gel a temperatura ambiente en una cámara húmeda. La lectura se llevó a cabo a las 24 h, 48 h y 72 h de incubación en un trans-iluminador de luz blanca con fondo oscuro.

La reacción positiva formó una línea de precipitación entre el pozo del suero control positivo y el pozo del antígeno. La línea de identidad formó una línea continua (**Figura 3**). Un suero fue considerado negativo cuando no se observó una línea de precipitación entre el pozo de suero problema y el pozo del antígeno (**Figura 4**)<sup>(18, 25, 26)</sup>.

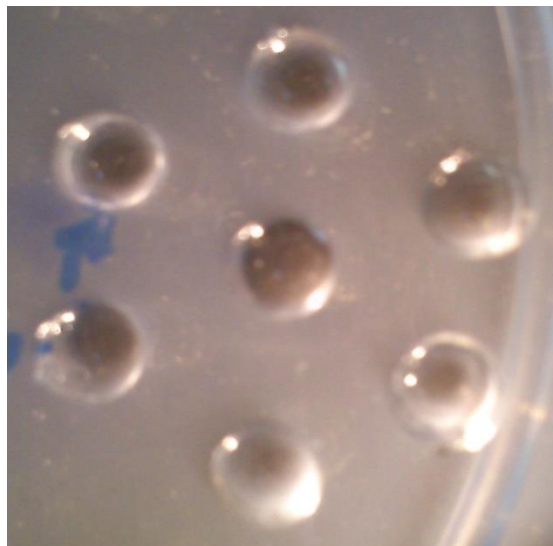
---

<sup>viii</sup> JT Baker®

<sup>ix</sup> JT Baker®



**Figura 3.** La reacción positiva a la prueba de AGID forma una línea de precipitación entre el pozo del suero control positivo o el suero problema y el pozo del antígeno, la cual, está señalada con las flechas rojas.



**Figura 4.** En la reacción negativa a la prueba de AGID, no se observa una línea de precipitación entre el pozo de suero problema y el pozo del antígeno.

## ELISA-I

- **Elaboración del Antígeno crudo sonicado**

Con las bacterias suspendidas en PBS se procedió a medir la concentración celular para ajustarla al 6% mediante la técnica del microhematocrito. Posteriormente la suspensión bacteriana se sometió a ruptura celular por sonicación<sup>x</sup> durante 30 min de ultrasonido a 60% de potencia con intervalos de 1 min de descanso y 1 min de sonicado. Colocando los tubos en un baño de hielo durante el proceso <sup>(27)</sup>. Se cuantificó la concentración proteica mediante la técnica de Bradford.

Finalmente el antígeno se fraccionó en viales de 5 ml, se identificó y almacenó en refrigeración a 4°C.

- **Titulación del antígeno y del anticuerpo secundario**

- Sensibilización de la microplaca

En una microplaca de poliestireno con 96 pozos de fondo plano<sup>xi</sup> se hicieron diluciones dobles seriadas del antígeno crudo sonicado de *B. canis* con PBS, iniciando con una dilución 1:50 hasta 1:800, poniendo 100 µl de cada dilución en

---

<sup>x</sup> SONICS® Vibracell VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter

<sup>xi</sup> Sarstedt®

cada fila. Ver **Tabla 2**. Se dejó incubar toda la noche a 37°C y se lavó 4 veces con 150 µl de PBS con Tween 20<sup>xii</sup> al 0.05% (PBS-T) en el lavador de microplacas<sup>xiii</sup>.

- Bloqueo de la microplaca

Se utilizó Skim milk<sup>xiv</sup> al 5%. Poniendo 150 µl en cada pozo y se incubó 1 h a 37°C, transcurrido ese tiempo se lavó 4 veces con 150 µl de PBS-T.

- Dilución de las muestras de suero

El blanco (BL), los controles positivos (C+) y controles negativos (C-) se hicieron pareados. Se realizó una dilución con PBS de los sueros 1:200, colocando 100 µl de la dilución de los sueros C+ y C- en cada pozo. A los pozos que sirvieron como blancos se les puso únicamente PBS. Se dejó incubando 1 h a 37°C y se lavó 4 veces con 150 µl de PBS-T.

- Dilución del conjugado IgG anti-perro marcado con peroxidasa

Se diluyó con PBS la IgG anti-perro marcada con peroxidasa<sup>xv</sup> 1:2500 y 1:5000; poniendo la dilución 1:2500 de la columna 1 a la 6 y la dilución 1:5000 de la columna 7 a la 12. **Tabla 2**. Se agregaron 100 µl en cada pozo. Se dejó incubando 1 h a 37°C y se lavó 4 veces con 150 µl de PBS-T <sup>(28)</sup>.

---

<sup>xii</sup> Sigma®

<sup>xiii</sup> Thermo Scientific® Microplate washer Wellwash™

<sup>xiv</sup> Difco®

<sup>xv</sup> Sigma® Anti-Dog IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in rabbit.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ag
<b>A</b>	BL	BL	C+	C+	C-	C-	BL	BL	C+	C+	C-	C-	1:50
<b>B</b>	BL	BL	C+	C+	C-	C-	BL	BL	C+	C+	C-	C-	1:100
<b>C</b>	BL	BL	C+	C+	C-	C-	BL	BL	C+	C+	C-	C-	1:200
<b>D</b>	BL	BL	C+	C+	C-	C-	BL	BL	C+	C+	C-	C-	1:400
<b>E</b>	BL	BL	C+	C+	C-	C-	BL	BL	C+	C+	C-	C-	1:800
<b>IgG 1:2500</b>						<b>IgG 1:5000</b>							

**Tabla 2.** Representación esquemática de la distribución de los sueros controles, las diluciones del antígeno y del anticuerpo primario en una placa de ELISA de 96 pozos. BL= Blanco, C+= Control positivo, C-=Control negativo, Ag=Antígeno, IgG=Inmunoglobulina G.

- Revelado

Se agregaron 100  $\mu$ l de ABTS<sup>xvi</sup> en cada pozo, cubriendo la placa con papel aluminio y se dejó durante 20 min en agitación.

La lectura se realizó en un lector de micro placas de ELISA<sup>xvii</sup> a 490 nm.

- **Realización de la técnica**

Para sensibilizar la placa se hizo una dilución 1:50 del antígeno crudo sonificado con PBS, se colocaron 200  $\mu$ l en cada pozo y se dejó incubar toda la noche a 37°C cubriendo la micro placa con papel aluminio. Se lavó cuatro veces con 150  $\mu$ l de PBS-T. Posteriormente se bloqueó con 150  $\mu$ l de Skim milk al 5% y se incubó 1 h a 37°C y se lavó cuatro veces con 150  $\mu$ l de PBS-T.

Se diluyeron los sueros 1:200 con PBS, se colocaron 100  $\mu$ l de la dilución en el pozo correspondiente, se dejó incubar por 1 h a 37°C y se lavó 4 veces con 150  $\mu$ l de PBS-T. Las muestras se trabajaron por duplicado.

Se realizó una dilución 1:2500 de la IgG anti-perro marcada con peroxidasa, agregando 100  $\mu$ l a cada pozo, se dejó incubar 1 h a 37°C y se lavó la placa 4 veces con 150  $\mu$ l de PBS-T.

---

<sup>xvi</sup> Merck Millipore®

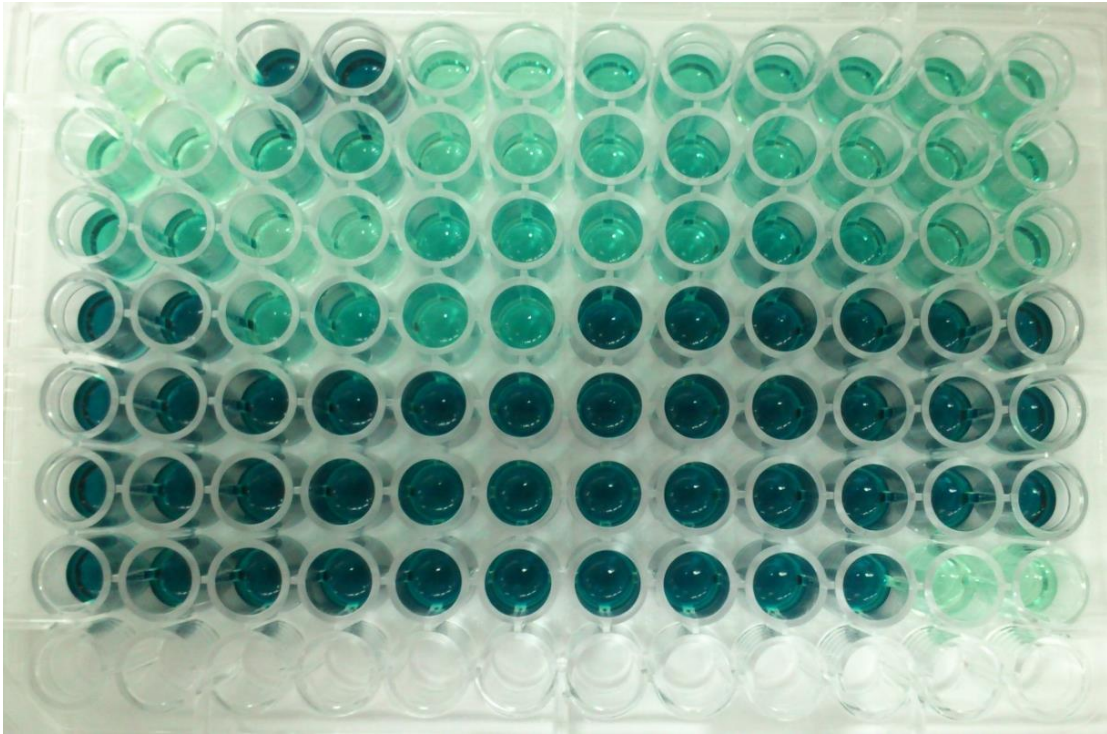
<sup>xvii</sup> VICTOR™3 Perkin Elmer



Para el revelado se agregaron 100  $\mu$ l de ABTS en cada pozo, cubriendo la placa con papel aluminio y dejándola durante 20 min en agitación (**Figura 5**). La lectura se realizó en un lector de micro placas de ELISA a 490 nm <sup>(28)</sup>.

- **Punto de corte**

Para discriminar sueros positivos de los negativos se determinó el punto de corte. A las lecturas de los controles positivos obtenidas de tres repeticiones independientes; se estimó la media aritmética y la desviación estándar, y se definió el punto de corte como la media menos tres desviaciones estándar. A las lecturas de los controles negativos obtenidas de tres repeticiones independientes; se estimó la media aritmética y la desviación estándar, y se definió el punto de corte como la media menos más tres desviaciones estándar <sup>(29, 30)</sup>.



**Figura 5.** El revelado del ELISA-I se hizo con ABTS y la lectura se realizó a 490 nm.

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS ANTÍGENOS

Se empleó el microensayo de Bradford para medir el contenido de proteínas totales de los antígenos para RSAT, AGID Y ELISA-I; el cual se basa en la unión de un colorante (azul de Comassie G-250) a los aminoácidos Alanina y Leucina; al unirse forma un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible ya que detecta desde 1-15 µg de proteína en una muestra y pocas sustancias, entre ellas los detergentes interfieren en su determinación.

Primero se determinó la curva de referencia, la solución de trabajo fue BSA<sup>xviii</sup> 2mg/ml de la cual se establecieron 4 concentraciones diferentes que fueron 2 µg, 5 µg, 10 µg y 20 µg en un volumen de 800 µl con agua destilada en microtubos de centrifuga. Se hizo por duplicado. Como blanqueador se utilizó agua destilada. Posteriormente a cada microtubo se le agrego 200 µl de *Protein Assay*<sup>xix</sup> y se homogenizó en el vortex por 15 seg. Se dejaron incubando por 5 min. El contenido de cada microtubo se vació en cubetas para espectrofotometría<sup>xx</sup> para realizar la lectura en el espectrofotómetro<sup>xxi</sup> a 590 nm. Tras conocer los valores de DO de cada una de las diluciones de BSA, por medio de Excel<sup>xxii</sup> se creó una regresión lineal se realizó la curva estándar y se obtuvo la fórmula de la ecuación <sup>(31)</sup>.

A cada antígeno se le determinó la concentración de proteína, se requirieron 3 µl de los antígenos de RSAT y ELISA-I, mientras que del antígeno de AGID se

---

<sup>xviii</sup> Sigma®

<sup>xix</sup> Bio Rad® Protein Assay.

<sup>xx</sup> Bio Rad®

<sup>xxi</sup> Spectrumlab 22.

<sup>xxii</sup> Microsoft Office®, Microsoft Excel 2010™

necesitaron 50 µl, se aforó a 800 µl, se agregaron 200 µl de *Protein Assay* y se homogenizó en el vortex por 15 seg. Se dejaron incubando por 5 min. El contenido de cada microtubo se vació en cubetas para espectrofotometría para realizar la lectura en el espectrofotómetro a 590 nm. Para conocer la concentración proteica de cada uno de los antígenos, se correlacionó la absorbancia obtenida con la curva estándar de BSA que proporcionó una fórmula mediante regresión lineal.

## **SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS**

El porcentaje de sensibilidad y especificidad de las pruebas fue calculada siguiendo las siguientes fórmulas <sup>(27)</sup>:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \times 100$$

## 6. RESULTADOS

### RSAT

El antígeno elaborado resultó tener una concentración celular de 6.13% y concentración proteica de 1.70 µg/µl. La prueba realizada bajo las condiciones antes descritas, resultó tener una sensibilidad de 86.4% y una especificidad de 100%.

### AGID

El antígeno salino caliente elaborado con *B. canis* resultó con una concentración celular de 6.83% y una concentración proteica de 0.05 µg/µl. La prueba realizada bajo las condiciones antes descritas resultó tener una sensibilidad de 70.4% y una especificidad de 100%.

### ELISA-I

El antígeno crudo sonicado elaborado resultó con una concentración celular de 6.4% y la concentración proteica fue de 3.24 µg/µl.

Se determinó que la dilución óptima del antígeno con estas características fue 1:50, la dilución del suero fue de 1:200 y la dilución óptima del anticuerpo secundario resultó en 1:2500. Por lo tanto, la prueba realizada bajo estas condiciones resultó tener una sensibilidad de 100% y una especificidad de 100%.

En el grupo control positivo se obtuvieron los siguientes resultados: media= 0.494; desviación estándar (DE)= 0.013; Amplitud= 0.460-0.511.

En el grupo control negativo los resultados fueron los siguientes: media= 0.202; desviación estándar (DE)= 0.031; Amplitud= 0.129-0.267.

A las lecturas de los controles positivos obtenidas de tres repeticiones independientes, se definió el punto de corte como la media menos tres desviaciones estándar.

A las lecturas de los controles negativos obtenidas de tres repeticiones independientes, se definió el punto de corte como la media más tres desviaciones estándar.

Por lo tanto, los el punto de corte determinado para esta prueba fue de: DO mayor o igual a 0.455 se cataloga como positivo, DO de 0.294-0.454 se catalogan como sospechosos y DO menor o igual a 0.295 se cataloga como negativo.

En este punto de corte la sensibilidad y especificidad obtenida es de 100% y 100%, respectivamente.

A continuación se muestra en la **Tabla 3** y la **Tabla 4** los resultados obtenidos con cada uno de los sueros positivos y negativos a pruebas de RSAT, AGID y ELISA-I con los antígenos elaborados.

	No. suero	RSAT	AGID	ELISA-I
<b>Grupo C-</b>	833 08-06-10	-	-	-
	836 08-06-10	-	-	-
	864 08-06-10	-	-	-
	627 08-06-10	-	-	-
	617 08-06-10	-	-	-
	375 08-06-10	-	-	-
	596 08-06-10	-	-	-
	044 08-06-10	-	-	-
	022 08-06-10	-	-	-
	Rumy	-	-	-
	Peluzza	-	-	-
	7 D.0	-	-	-
	037 D.0	-	-	-
	12 D.0	-	-	-
	374 D.0	-	-	-
	101 D.0	-	-	-
	572 D.0	-	-	-
<b>Totales</b>	<b>Negativos= 17</b>	<b>Negativos= 17</b> <b>Positivos= 0</b>	<b>Negativos= 17</b> <b>Positivos= 0</b>	<b>Negativos= 17</b> <b>Positivos= 0</b>

**Tabla 3.** Número de sueros y resultados de cada una de las pruebas del grupo Control negativo (C-).

	No. suero	RSAT	AGID	ELISA-I
<b>Grupo C+</b>	836 13-09-10	+	+	+
	836 27-09-10	+	-	+
	864 13-09-10	+	-	+
	864 27-09-10	+	-	+
	627 13-09-10	+	+	+
	627 27-09-10	+	-	+
	617 13-09-10	+	+	+
	617 27-09-10	+	-	+
	375 13-09-10	+	+	+
	375 27-09-10	+	+	+
	044 13-09-10	+	+	+
	044 27-09-10	+	+	+
	B07 407	+	-	+
	RM08 135	+	+	+
	RM112 095	+	+	+
	RM07 1628	-	+	+
	RM07 993	-	-	+
	B08 406	+	+	+
	B07 1629	-	-	+
<b>Totales</b>	Positivos=19	Positivos= 16 Negativos= 3	Positivos= 11 Negativos= 8	Positivos= 19 Negativos= 0

**Tabla 4.** Número de sueros y los resultados de las pruebas del grupo Control positivo (C+).



Los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad fue para la ELISA-I que presentó 100% tanto de sensibilidad como de especificidad; seguido por RSAT que mostró una menor sensibilidad de 86.4% y la especificidad fue de 100% y por ultimo AGID que fue la prueba que mostró tener la menor sensibilidad de 70.4% y la especificidad de 100% (**Tabla 5**).

<b>Prueba serológica</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>
<b>RSAT con 2<math>\beta</math>ME</b>	86.4%	100%
<b>AGID</b>	70.4%	100%
<b>ELISA-I</b>	100%	100%

**Tabla 5.** Comparación de la sensibilidad y especificidad de RSAT, AGID y ELISA-I

## 7. DISCUSIÓN

La brucelosis canina es una enfermedad que al producir infertilidad repercute económicamente en los criaderos caninos ya que disminuye la vida productiva de los animales infectados; y representa un riesgo potencial tanto para los propietarios de los perros afectados, los médicos veterinarios, el personal de laboratorio diagnóstico y desde luego, para otros perros.

Las pruebas serológicas son muy importantes al momento de realizar el diagnóstico de la brucelosis canina, ya que en conjunto con los signos clínicos apoyan al médico veterinario para llegar a un diagnóstico y de esta manera llevar a cabo la toma de decisiones en cuanto a tratamiento y control de la enfermedad. De ahí la necesidad de que los laboratorios de diagnóstico cuenten con los antígenos y técnicas adecuadas para el diagnóstico de la brucelosis en perros.

La elección de las pruebas evaluadas, fue por su sensibilidad y especificidad. Se ha probado que AGID detecta mínimo 30.0 µg/ml de proteína procedente de los anticuerpos presentes en el suero sospechoso, RSAT detecta 0.05 µg/ml de proteína y ELISA detecta 0.0005 µg/ml de proteína <sup>(32)</sup>. Con lo cual se determina que la probabilidad de identificar correctamente aquellos individuos enfermos que están infectados es más alta empleando un ELISA, seguido de RSAT y finalmente el AGID. Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado respecto a la sensibilidad de la ELISA-I.

En el presente trabajo se observó que las tres pruebas presentan una opción para realizar el diagnóstico serológico.

Las ventajas de la prueba de RSAT es la facilidad para llevar acabo la técnica serodiagnóstica y la rapidez con que se emite el resultado <sup>(5)</sup>. Sin embargo, una de las desventajas es el especial cuidado y control de calidad para la elaboración del antígeno para la prueba, ya que el cultivo bacteriano que se usa para este fin debe permanecer (M-) para que no auto aglutine y de falsos positivos, lo cual, repercute directamente en la especificidad de la prueba <sup>(22, 26)</sup>; el tiempo que toma desde la cosecha de las bacterias hasta la tinción con rosa de bengala son mínimo 7 a 8 días de trabajo constante y por el momento no existe un laboratorio comercial en México que lo produzca.

Entre las ventajas de la prueba de AGID se pueden citar su elevada especificidad <sup>(22)</sup> y el hecho de que no requiere de equipo especializado para llevar a cabo la lectura. Su desventaja es que el resultado puede demorar hasta 72 h y la sensibilidad es la más baja de las pruebas que se estudiaron en este trabajo.

En cuanto a la prueba de ELISA-I, las ventajas son: que posee una alta sensibilidad y especificidad y en unas cuantas horas se obtiene un resultado <sup>(15)</sup>. La desventaja es que pueden variar los valores de las lecturas de DO por la calidad del ABTS, el lote y la marca de los antígenos secundarios y la precisión que se requiere en el pipeteo, por lo que se recomienda realizar la titulación cuando se cambien dichos reactivos <sup>(27)</sup>.

Los datos presentados indican claramente que en términos de sensibilidad el ELISA-I ha demostrado ser superior a las técnicas de RSAT y AGID y el procedimiento descrito en este estudio es relativamente simple de realizar por lo

que los laboratorios de diagnóstico veterinario pueden adoptar la técnica para ofrecerla al público dado que el equipamiento que requieren los laboratorios de diagnóstico para establecerlo en sus instalaciones es accesible por el bajo costo de los equipos que se emplean. Sin embargo, siempre sería conveniente contar con un antígeno estandarizado para todos los laboratorios, así como los mismos sueros testigos positivos y negativos.

Existen diversas publicaciones de técnicas diagnósticas para la brucelosis canina, un ejemplo es el trabajo que realizaron de Oliveira y colaboradores., en 2011 donde validan un ELISA-I empleando un antígeno sonicado. En este estudio obtuvieron una especificidad de 100% y sensibilidad de 84.31% y determinaron el punto de corte de DO 0.323 en adelante como positivos<sup>(27)</sup>.

Keid y colaboradores., en 2009 compararon la sensibilidad y especificidad de las pruebas de AGID, RSAT sin 2βME y RSAT con 2βME con kit comercial que contenía antígenos hechos con *B. ovis* y usando como pruebas confirmatoria el aislamiento bacteriológico y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los resultados fueron que AGID mostró tener una sensibilidad de 52.94% y especificidad de 100%, RSAT sin 2βME mostró tener una sensibilidad de 70.58% y especificidad de 83.34%; y RSAT con 2βME mostró sensibilidad de 31.76% y especificidad de 100%. Atribuyen la reducción tan drástica de sensibilidad de RSAT con 2βME a que los perros estaban en fase temprana de infección donde cambia la producción de anticuerpos de IgM a IgG<sup>(22)</sup>.

Este trabajo recopila los protocolos para obtener los antígenos de las tres técnicas para diagnóstico serológico para la brucelosis canina, describe la forma en que se aplican cada una de ellas, su interpretación y sugiere un punto de corte para el ELISA-I. Si bien existen trabajos previos sobre el comportamiento de diferentes antígenos y pruebas usadas para el diagnóstico de la brucelosis canina, solo una pequeña porción son actuales y en estos no están bien detalladas las metodologías.

En el presente trabajo se observó que las tres pruebas propuestas son una buena opción para realizar el diagnóstico serológico, e inclusive siempre se recomienda utilizar más de una prueba para demostrar la infección, por lo que podrían utilizarse en combinación.

En trabajos posteriores y para complementar este trabajo, sería ideal contar con reportes epidemiológicos actuales dentro del territorio nacional o reportes de casos donde dichas pruebas sean una herramienta para realizar al diagnóstico.

Perspectivas:

Hoy en día la presente investigación se encuentra en la etapa de purificación de proteínas de membrana externa de *B. canis* las cuales tienen propiedades antigénicas adecuadas para desarrollar un ELISA-I, tales como la antigenicidad, esto con la finalidad de que el diagnóstico serológico sea más sensible y reducir la probabilidad de una reacción cruzada con bacterias como *Pseudomona aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica*, incluso se ha observado que *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus feacalis*<sup>(26)</sup>.

## 8. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se elaboraron tres antígenos para el diagnóstico serológico de *B. canis*: el antígeno teñido con rosa de bengala para RSAT, el antígeno salino caliente y el antígeno crudo sonicado.
2. La prueba de RSAT para *B. canis* con el antígeno elaborado, resultó con una sensibilidad y especificidad de 84.6% y 100%, respectivamente.
3. La prueba de AGID con el antígeno salino caliente de elaborado con *B. canis*, resultó con una sensibilidad y especificidad de 70.4% y 100%, respectivamente.
4. Se estandarizó la metodología para realizar la prueba de ELISA-I con el antígeno crudo sonicado elaborado con *B. canis*, determinando las diluciones óptimas del antígeno y anticuerpo secundario.
5. Se determinó el punto de corte del ELISA-I con las lecturas obtenidas.
6. El ELISA-I con el antígeno crudo sonicado elaborado con *B. canis*, resultó con una sensibilidad de 100% y especificidad de 100%.
7. De las tres pruebas, AGID fue la que obtuvo una menor sensibilidad, por lo tanto se corre el riesgo de dictaminar un diagnóstico serológico falso negativo. Las tres pruebas resultaron con una muy buena especificidad.
8. Se recomienda la utilización de la prueba de ELISA-I, ya que se obtienen resultados en pocas horas y sobre todo es más sensible.

## BIBLIOGRAFÍA

1. E. Díaz, G. Valero, B. Arellano. Diagnóstico de Brucelosis Animal. México: INIFAP, IICA, OPS; 2001. p. 322.
2. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2010;60(Pt 4):801-8.
3. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Frontiers in microbiology. 2014;5:213.
4. Carmichael LE, Joubert JC. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. The Cornell veterinarian. 1987;77(1):3-12.
5. Sánchez-Rodríguez MC. Casos anuales de *B. canis* recibidos en la FMVZ-UNAM. México: UNAM; 2014.
6. Briseño-González H, Páramo-Rámirez RM, Flores-Castro R, Suarez F. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. Veterinaria México. 2004;35(2):128.

7. Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. The Cornell veterinarian. 1988;78(1):63-73.
8. Wanke MM. Canine brucellosis. Animal reproduction science. 2004;82-83:195-207.
9. Flores-Castro R, Suarez F, Ramirez-Pfeiffer C, Carmichael LE. Canine brucellosis: bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. Journal of clinical microbiology. 1977;6(6):591-7.
10. Morgan RV. Clínica de pequeños animales 3° ed. Madrid, España: Harcourt Brace; 1999. p. 1436.
11. Thomas Carlyle Jones RDH, Norval W. King. Veterinary Pathology. 6° ed. E. U. A.: Williams & Wilkins; 1997. p. 1392.
12. Lowrie DB, Kennedy JF. Erythritol and threitol in canine placenta: possible implication in canine brucellosis. FEBS letters. 1972;23(1):69-72.
13. Tennant IKRBJ. Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales. Barcelona, España: Ediciones S; 2013. p. 391.
14. Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. Theriogenology. 2006;66(3):575-87.



15. Barrouin-Melo SM, Poester FP, Ribeiro MB, de Alcantara AC, Aguiar PH, Nascimento IL, et al. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. Research in veterinary science. 2007;83(3):340-6.
16. Rodríguez-Sánchez MC. Estandarización de un antígeno de *Brucella canis* M(-) para el diagnóstico de brucelosis canina por medio de la prueba de aglutinación en placa [Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1996.
17. George LW, Carmichael LE. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. The Cornell veterinarian. 1978;68(4):530-43.
18. Nunez-Torres E, Diaz-Aparicio E, Tenorio VR, Hernandez L, Marin C, Suarez-Guemes F. Stability of antigen and agarose used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 1998;10(1):113-5.
19. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales, NOM-041-ZOO-1995, México (8 de Noviembre de 1995).

20. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. Journal of medical microbiology. 2005;54(Pt 5):457-61.
21. Flores-Castro R, Segura R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. The Cornell veterinarian. 1976;66(3):347-52.
22. Keid LB, Soares RM, Vasconcelos SA, Megid J, Salgado VR, Richtzenhain LJ. Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. Research in veterinary science. 2009;86(1):22-6.
23. George LW, Carmichael LE. A plate agglutination test for the rapid diagnosis of canine brucellosis. American journal of veterinary research. 1974;35(7):905-9.
24. Michel J. Day AM, Janet D. Littlewood. BSAVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. England: BSAVA; 2000. p. 320.
25. OIE. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 2. 7° ed. España: OIE; 2012. p. 1423.
26. Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Developments in biological standardization. 1984;56:371-83.

27. de Oliveira MZ, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Research in veterinary science. 2011;90(3):425-31.
28. Palomares-Resendiz EG. Estudio de la supervivencia intracelular de mutantes *virB* de *Brucella canis*, y determinación de su capacidad como inmunógenos. [Doctorado]. México D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
29. Guitierrez-Fajardo A, Yamamoto-Kimura L, Yáñez-Velasco L, Garduño-Espinosa J, Martínez-García MC. Utilidad de las curvas de sensibilidad y especificidad conjunta en la aplicación de una prueba de diagnóstico. Salud Pública de México. 1994;36(3):311-7.
30. Cannova D, Aguilar-Cruz M, Pacheco M, Simons MI, Medina M. Validación del Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y Hemoaglutinación Indirecta (HAI) para el Serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de Carabobo. 2002;6(3):35.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72:248-54.

32. Jaramillo Arango CJ. Epidemiología Veterinaria. México: Manual Moderno; 2010. 189 p.

## APÉNDICE: PREPARACIÓN DE MEDIOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES

### 1) Tinción de Gram

- I. En un portaobjetos limpio colocar unas gotas de suspensión bacteriana, o si el cultivo es sólido poner unas gotas de agua destilada para disolver un poco de colonia.
- II. Dejar secar el frotis a temperatura ambiente.
- III. Fijar el frotis pasando la laminilla dos a tres veces por la llama del mechero.
- IV. Agregar cristal violeta y bicarbonato de sodio durante 15 segundos. Lavar con agua destilada.
- V. Agregar iodo por 15 segundos. Lavar con agua destilada.
- VI. Agregar alcohol-acetona durante 3 a 5 segundos. Lavar con agua destilada.
- VII. Agregar fucsina básica por 15 segundos. Lavar con agua destilada, secar el frotis a temperatura ambiente.
- VIII. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).

### 2) TSA

TSA	40 g
Agua destilada	1000 ml

3) TSA duro

TSA	40 g
Agar bacteriológico	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

4) SSF pH 7.4

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

5) PBS 10x (pH 7.4, 10 Mm)

Solución A	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	10.96 g en 150 ml de agua destilada.
Solución B	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 (\text{H}_2\text{O})$	3.15 g en 150 ml de agua destilada.

Mezclar la solución A y B, aforar a 400 ml con agua destilada y si es necesario ajustar el pH con HCl 1 N.

6) PBS-Tween al 0.05%

Tween 20	500 $\mu\text{l}$
PBS 1x	1000 ml

7) Buffer Tris-Maleato 0.4 M (pH 8.6)

Solución A      Ácido maléico 0.4 M      46.43 g cbp 1000 ml

Solución B      Trizma base 0.4 M      48.45 g cbp 1000 ml

Hacer una solución al 50% V/V de sol A y sol B y ajustar el pH con Hidróxido de sodio 4 N.

Agua destilada      cbp 1000 ml

8) 2β Mercaptoetanol 0.2 M

2β Mercaptoetanol      1.56 ml

Agua destilada      cbp 100 ml

9) Buffer de Borato 30 mM (pH 8.3)

Ácido bórico      0.19 ml

Cloruro de potasio      0.72 ml

En caso de ser necesario se lleva al pH deseado con Hidróxido de sodio 0.2 N.

Agua destilada      cbp 100 ml

10) Cloruro de sodio al 11%

Cloruro de sodio      10.45 g

Agua destilada      95 ml

11) Gel de agarosa al 0.8%

Agarosa	0.8 g
Buffer de Borato 30 mM	5 ml
Cloruro de sodio al 11%	95 ml