

## EVALUACIÓN DE UN MÉTODO SEROLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRUCELLA CANIS

Baruta, D.A.<sup>1</sup>; Ardoino, S.M.<sup>1</sup>; Riesco, S.R.<sup>2</sup>; Marengo, M.L.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Enfermedades Infecciosas. Fac. Cs. Veterinarias. UNLPam.

<sup>2</sup> Química Biológica. Fac. Cs. Veterinarias. UNLPam. [debaruta@infovia.com.ar](mailto:debaruta@infovia.com.ar)

### RESUMEN

Teniendo en cuenta que para la determinación serológica de anticuerpos contra *Brucella canis* existen distintos métodos, y que la mayoría de ellos son imprecisos en cuanto a la detección de verdaderos positivos, es que dirigimos el presente trabajo hacia la evaluación del Test de Aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT), en comparación con la prueba de Inmunodifusión en gel de Agar (AGID), a los efectos de obtener su sensibilidad, especificidad y valor predictivo. Debemos tener en cuenta que si bien el número de animales muestreados no es demasiado alto, los resultados obtenidos de la comparación de este test contra el Gold estándar nos permitieron obtener una sensibilidad relativa del 100%, especificidad relativa del 96.23% y un valor predictivo positivo del 66.66%.

**Palabras claves:** Aglutinación rápida en portaobjetos, *Brucella canis*, sensibilidad, especificidad, valor predictivo.

**Evaluation of a serologic method for the detection antibodies against *Brucella canis*.**

### SUMMARY

Taking into account that there are diverse methods for the antibodies serologic determination against *Brucella canis*, and that the majority of these methods are imprecise in terms of the detection of true positive, it is that we focus present work toward the evaluation of the rapid plate agglutination test (RSAT), in comparison with the agar gel immunodiffusion test (AGID). Such studies were carried out with the aim of obtaining their sensibility, specificity and predictive value. We should keep in mind that although the sample animals are not a big amount, the results obtained comparing this test with the standard gold allowed us to obtain a relative sensibility of 100%, a relative specificity of 96.23% and a positive predictive value of 66.66%.

**Key words:** Rapid slide agglutination test (RSAT). *Brucella canis*. Sensibility, specificity, predictive value.

### INTRODUCCION

La investigación de la enfermedad o la infección mediante la valoración de variables presentes en el suero sanguíneo se denomina epidemiología serológica. El análisis de globulinas como anticuerpos específicos que evidencian la exposición actual o anterior al agente infeccioso en estudio es un método considerado relativamente eficaz y barato en medicina veterinaria.

Cuando se desea determinar la presencia de anticuerpos en una población animal sin importar particularmente el título

de los mismos, los resultados se expresan como "positivos" y "negativos". El que una prueba detecte o no los anticuerpos no depende sólo de la exposición de la población al antígeno específico sino también de la capacidad de la técnica para detectar o no dichos anticuerpos.

Como parámetros de la validez de las técnicas diagnósticas utilizamos los conceptos de sensibilidad y especificidad.

Como definición de la sensibilidad de un método, podemos decir que es la proporción de verdaderos positivos detectados por el mismo; en tanto que definimos como especificidad de un método la

proporción de verdaderos negativos que son detectados por el mismo. Especificidad y sensibilidad pueden ser expresadas como una probabilidad entre cero y uno o como porcentaje. Existe una relación inversa entre sensibilidad y especificidad de una técnica determinada.

Para interpretar correctamente los resultados de una evaluación en epidemiología serológica incorporamos el concepto de valor predictivo de la técnica, que es la probabilidad de que un animal "positivo" según la técnica empleada sea realmente positivo. El parámetro más frecuentemente utilizado como valor predictivo de una técnica es el valor predictivo del resultado positivo de la misma.

El valor predictivo depende de la especificidad, la sensibilidad y de la prevalencia. Las dos primeras expresiones son características inherentes a la técnica y no varían, en tanto que la prevalencia afecta a la proporción de animales positivos a la técnica que realmente están enfermos (Thrusfield, 1990).

Las pruebas diagnósticas de Brucelosis canina disponibles en el mercado son relativamente imprecisas, ya que los antígenos superficiales de las Brucelas rugosas, tales como *B. canis* dan reacción cruzada con anticuerpos de muchos otros microorganismos no patógenos.

Los métodos usados más comúnmente son: Test rápido de aglutinación en portaobjetos (RSAT), test de aglutinación en tubo (TAT), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y una prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes.

El RSAT utiliza como antígeno *Brucella ovis* teñida con Rosa de Bengala, la cual da reacción cruzada con *B. canis*. Esta prueba requiere de un tratamiento del suero con 2 Mercapto etanol (0.2M) y esta disponible para su utilización en nuestro país. Una prueba negativa es fuerte evidencia que el perro no está infectado, pero un porcentaje de los canes cuyo resultado es una aglutinación no presentan la enfermedad, por lo tanto se sugiere la utilización de pruebas complementarias (Carmichael, 1998).

Los perros positivos en todos los casos deben ser sometidos a pruebas adicionales como cultivos de sangre, que siempre están indicados, debido a los perío-

dos de bacteriemia prolongada característicos de esta especie, que puede durar uno a más años (Kiatisewee et al., 1997).

La inmunodifusión en gel de agar (AGID) usa antígenos de pared celular. La misma es una prueba más específica que la anterior, pero también da lugar aunque en menor proporción a la aparición de falsos positivos.

Las mejores pruebas serodiagnósticas son: un RSAT pero empleando una cepa mutante (mucoide) de *B. canis*, con alta especificidad (M-SAT), una prueba de inmunodifusión en agar gel (AGID<sub>cpa</sub>) con antígenos proteicos citoplasmáticos específicos para *Brucella* spp y que sirven para distinguir perros infectados de no infectados que poseen anticuerpos reaccionantes en las pruebas de aglutinación o AGID. También se puede recurrir a ELISA que usa como antígenos extractos de la pared celular LPS (lipopolisacárido) de *B. canis* (cepa mucosa) o proteínas citoplasmáticas de *B. abortus* y una prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Indudablemente para la completa identificación de cepas sospechosas se debería utilizar la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y los cultivos de sangre. (Teherneva et al., 1996).

El RSAT es una prueba rápida que no requiere preparación técnica ni instrumental sofisticado para su realización. En consecuencia se presenta como una opción interesante para el diagnóstico de Brucelosis canina en clínicas veterinarias.

No contamos con datos del laboratorio elaborador del antígeno (Reactivo *Brucella canis*. Rosembusch), acerca de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo de la técnica, situación esta que ha motivado la realización del presente trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó para esta experiencia el suero de 200 caninos pertenecientes a la zona urbana de la ciudad de General Pico (La Pampa). Las muestras de sangre fueron extraídas por punción de la vena cefálica, depositándose en tubos sin anticoagulante a los efectos de obtener el suero. Las mismas fueron centrifugadas y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

Todos los sueros se sometieron al test inmunodifusión en gel de agar (AGID), utilizando la técnica modificada por Miranda y col. con antígeno provisto por SENASA. Acto seguido los mismos sueros fueron evaluados mediante el test de aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT) según la técnica especificada por el laboratorio productor del antígeno.

## RESULTADOS

De los 200 caninos estudiados por ambos métodos se encontró una concordan-

cia general del 96.5%. Con respecto al total de muestras positivas, hubo acuerdo en las 14 (catorce) muestras (100%). Con las negativas, el acuerdo fue menor (96,2%) ya que de 186 (ciento ochenta y seis) muestras negativas, los test solo coincidieron en 179 (ciento setenta y nueve). En este grupo, 7 (siete) de ellas se consideraron como falsos positivos porque no hubo concordancia con el gold estándar. En consecuencia la sensibilidad hallada fue del 100 %, la especificidad del 96.23% y el valor predictivo positivo del 66.66%. Los resultados se detallan en Tabla 1 y 2.

**Tabla 1.** Valores hallados para RSAT contra AGID.

	AGID +	AGID -	Total
RSAT +	14	7	21
RSAT -	0	179	179
Total	14	186	200

**Tabla 2.** Valores hallados de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo.

	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo+
RSAT vs AGID	100 %	96.23 %	66.66 %

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a no contar en nuestro medio con técnicas como ELISA o PCR para la detección de anticuerpos o antígenos contra *Brucella canis* hemos optado por utilizar como Gold Estándar la técnica de AGID. Si bien no es la ideal, posee una sensibilidad y especificidad mayor que el RSAT (Carmichael, 1998).

Evidentemente existe una fuerte evidencia que es una prueba útil en lo que se refiere a la detección de animales serológicamente negativos, pero que al compararla con otra más específica nos muestra que es menor el porcentaje de hallazgos positivos que son efectivamente positivos.

Por otro lado, como el número de caninos muestreados no fue lo suficientemente elevado no se ha podido obtener una cantidad importante de muestras positivas, hecho que de haber sido posible le daría mas peso estadístico a nuestros resultados.

El número de casos de Brucelosis confirmados positivos fueron 14 (catorce) mientras que los negativos fueron 186 (ciento ochenta y seis).

A pesar de esto, y por no poseer datos relacionados con la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de RSAT del laboratorio productor de este antígeno, los resultados del presente trabajo son orientadores en cuanto al alcance del RSAT.

Teniendo en cuenta que el RSAT es de fácil y rápida realización, no requiere de instrumental sofisticado, presenta una buena sensibilidad y especificidad, se puede sugerir su uso como prueba tamiz en clínicas veterinarias privadas para el diagnóstico de Brucelosis canina. Entendemos que los hallazgos obtenidos permiten estimar las ventajas y limitaciones de este test, como asimismo interpretar con mejor criterio los resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFIA

- ALTON, G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E.** -1976- Las técnicas de Laboratorio en la Brucelosis. Seg. Ed. Org. Mund. de la Sal. Cap. 1-6.
- BALDI, P.C.; WANKE, M.M.; LOZA, M.E.;** -1994- Brucella abortus cytoplasmatic proteins used as antigens in and ELISA potencial usefull for the diagnosis of Canine Brucelosis. Vet. Microbiol. 47:127-134.
- BARUTA, D.A.; ARDOINO, S.M.; RIESCO, S.R.; MARENCO, M.L.; BRANDAN, J.L.; ORIANI, D.S.** -2000- Diagnóstico de Brucella canis en la ciudad de General Pico (La Pampa). Rev. Pets. Vol. 16. Nº 86. 57-60.
- CARMICHAEL, L.E.** -1998- Brucelosis canina causada por Brucella canis: Enfermedad clínica; problemas en inmunodiagnóstico. XXIII Cong. Asoc. Mund. Med. Vet. peq. Anim.. Bs.As. T. 1. 327-332.
- JOHNSON, C.A.** -1992- Clinical signs and Diagnosis of Brucella canis infection. Comp.Cont.Educ.Pract.Vet. 14 - 763 - 772.
- KIATISEWEE, S.; NILKUMHANG, P.; SAKPUARAM, T.; THEERALEEKUL, T.** -1997- CANINE BRUCELOSIS: The 2 Mercaptoetanol – Rapid Slide Agglutination Test and Bacteriological Detection – Kasetsart Jour., Nat. Scien. 31: 2, 199- 205 ; 8 ref.
- MIRANDA, A.D.; BAEZ, E.N.; ACOSTA R. S.; LAFFONT, H. M.; MARDER, G.** -1998- Tasa de Prevalencia Humana de Anticuerpos contra Brucelas Clásicas y Brucella canis en la ciudad de Corrientes (Argentina). Rev. Therios, Vol.27, Nº 143 . 254 - 258.
- NECSULESCU, M.,SARCA, M.; CATANA N., STAICU, L.** -1995- Brucella canis Infection: Diagnostic Methodos and Reagents. Studies and Researches in Veterinary Medicine. Jour. of the Pasteur Intit. Romania . 3 : 62-64; 6 ref.
- TEHERNEVA, E.; RIJPENS, N.; HERNAN L.; NAYDENSKY, C.** -1996- Repetitive Elemente Secuence based Polynerase Chain Reaction for Typing of Brucella Strains. Vet. Microb. 51: 1-2 , 169-178 ; 22 ref.
- THRUSFIELD, M.** -1990- Epidemiología Veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p. 219-232.