

EFICACIA DE DIVERSAS PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS PORCINA

Dieste-Pérez, L.¹, De Miguel, M.J.¹, Marín, C.M.¹, Barberán, M.², Blasco, J.M.¹, Muñoz, P.M*.¹ ¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930. 50059. Zaragoza (España). ² Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza *e- mail: pmmunnoz@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La brucelosis porcina causada por *Brucella suis* biovariedad 2 (*B. suis* bv.2) se considera una enfermedad emergente en toda Europa (Garin Bastuji *et al.*, 2000; Godfroid *et al.*, 2002) y se manifiesta clínicamente con abortos e infertilidad, ocasionando pérdidas económicas importantes en el sector porcino. El reservorio principal de la infección es el jabalí, cuyas poblaciones silvestres se hallan muy infectadas en la Península Ibérica (Muñoz *et al.*, 2010) y el resto de Europa (Garin Bastuji *et al.* 2000). Debido a la frecuente interacción del jabalí con el ganado porcino domestico criado al aire libre, la infección se ha establecido endémicamente en el cerdo ibérico (Munoz *et al.*, 2003). Además, recientes brotes sugieren que podría tener importancia también en el porcino intensivo de nuestro país. Pese a ello, el ganado porcino es considerado oficialmente exento de esta enfermedad en toda la UE, por lo que tan solo los reproductores objeto de movimiento intracomunitario y de los centros de inseminación son sometidos regularmente a control obligatorio, utilizándose para ello las pruebas serológicas de Rosa de Bengala (RB), Fijación del Complemento (FC) o también, los ELISAs indirecto (ELISA-i) o de competición. Sin embargo, ninguna de estas pruebas es totalmente satisfactoria para el diagnóstico individual de la brucelosis porcina. Además de la baja sensibilidad diagnóstica de alguna de ellas (por ejemplo, la FC), su principal inconveniente radica en la existencia de Reacciones Serológicas Falsas Positivas (RSFP) inducidas por infecciones por otras bacterias gramnegativas que comparten determinantes antigénicos con la cadena O del lipopolisacárido liso (S-LPS) de *Brucella*, destacando particularmente *Yersinia enterocolitica* O:9. (EFSA 2009).

Puesto que los antígenos citosólicos presentes en el periplasma y citoplasma de *Brucella* (denominados genéricamente “brucelina”) son específicos de este género bacteriano (sólo se hallan en otras bacterias de la clase alfa-Proteobacteria, y que no parecen afectar al ganado porcino), podrían utilizarse para diagnosticar la brucelosis y diferenciarla de las RSFP. Para ello es preciso utilizar extractos antigénicos totalmente libres de precursores biosintéticos de la cadena O, ya que la cepa mas usada para la obtención de brucelina (*B. melitensis* 115 M) posee dichos precursores (Cloeckaert *et al.*, 1992). Por el contrario, el mutante *B. abortus* manB_{core} carece de estos precursores (Monreal *et al.*, 2003) y cuando sus proteínas citosólicas son usadas como alérgeno en una prueba intradérmica, ésta resulta en una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la brucelosis porcina, incluso en presencia de RSFP (Dieste *et al.*, 2011). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre el uso de estas proteínas citosólicas para el diagnóstico serológico de la enfermedad, y además, el extracto citosólico del mutante manB_{core} nunca ha sido evaluado para tal fin. El objetivo del presente trabajo consistió pues en la puesta a punto de diferentes pruebas serológicas con dicho extracto antigénico, y la evaluación de su eficacia diagnóstica en porcino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han puesto a punto las pruebas de Inmunodifusión en gel (DG), contrainmunolectroforesis (CIE) y ELISA indirecto (ELISA-i), utilizando un extracto citosólico de la cepa *B. abortus* manB_{core} como antígeno y los protocolos descritos anteriormente (Muñoz *et al.*, 2005). En DG se usó también como antígeno S-LPS de *B. melitensis* 16M (Muñoz *et al.* 2005). Para DG y CIE se probaron diferentes concentraciones de antígeno (1,25-40 mg/ml), tampones (Borato, Veronal y Tris) conteniendo varias concentraciones de NaCl (0%, 5%, 10% y 20%) y distintas combinaciones voltaje/tiempo

(para CIE). Los geles se prepararon con el 1% de agarosa en ambos casos, utilizando agarosa de electroforesis (Sigma Aldrich) en DG y de baja electroendosmosis (Sigma Aldrich) para CIE. Las concentraciones óptimas de antígeno fueron 5 y 2.5mg/ml, respectivamente. La mejor eficacia se obtuvo usando tampón Borato (0.1M, pH 8.3) para la DG y tampón Veronal (20mM, pH 8.6) para la CIE, sin añadir NaCl. Los mejores resultados en CIE se obtuvieron realizando una primera lectura a las 3 horas tras la electroforesis (10 mA, 45 min.) y otra 24 h. después.

Para el ELISA-i se compararon distintos tampones (PBS y carbonato) para la fijación del antígeno y conjugados (anti IgG porcina monoclonal -Ingenasa SL- o policlonal -Nordic- y proteínas recombinantes A, G y A/G -Pierce-, todos ellos marcados con peroxidasa). La mejor eficacia se obtuvo usando Proteína G y siguiendo el protocolo descrito previamente (Muñoz *et al.* 2010), con ligeras modificaciones (dilución de suero 1/200 y lectura a los 30 minutos). Además, con el fin de optimizar la unión del antígeno a las placas de poliestireno (Nunc Maxisorp) y bloquear los sitios de unión inespecíficos de las proteínas se utilizó una solución estabilizante (SurModics).

Una vez determinadas las condiciones óptimas para cada prueba se evaluó su eficacia diagnóstica frente a una colección de sueros porcinos "Gold Standard". Para evaluar la sensibilidad diagnóstica (Se) se utilizó una población constituida por 169 sueros de cerdas infectadas naturalmente por *B. suis* bv. 2 (en todas ellas la infección se confirmó mediante aislamiento a partir de secreciones vaginales tras el aborto o de muestras de necropsia tras el sacrificio). La especificidad diagnóstica (Sp) se calculó utilizando 423 sueros de cerdas procedentes de granjas libres de infección. Además, se analizó el suero de 185 cerdas pertenecientes a varias granjas afectadas por RSFP y atribuidas a la infección por *Yersinia enterocolitica* O: 9. Todos los sueros fueron también analizados mediante las pruebas oficiales de RB estándar (RBst) y FC (OIE 2012). Además, se utilizó la prueba de RB modificada (-RBm-; Blasco *et al.*, 1994) y un ELISA-i comercial "I.B. Porcine" (Ingenasa S.L.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan en la Tabla 1. Como puede apreciarse, las pruebas usadas oficialmente mostraron una moderada (93,5%; RBst) o baja (72,2%; FC) sensibilidad para el diagnóstico de la infección. Además, ambas pruebas mostraron una baja especificidad en granjas afectadas por RSFP. Estos resultados coinciden plenamente con los descritos anteriormente (EFSA 2009), y cuestionan la estrategia diagnóstica recomendada por la UE. Por otro lado, la prueba de RBm resultó en una Se superior a la del RBst, pero también en una baja Sp (90,3%), por el elevado número de reacciones inespecíficas ocurridas en cerdos de granjas libres de brucelosis. Por el contrario, el ELISA-i I.B Porcine (que había sido previamente validado en nuestro laboratorio (Muñoz *et al.*, 2012) ofreció un 100% de Sp en granjas libres de Brucelosis y una elevada Se (95,3%) para diagnosticar la infección. Sin embargo, la especificidad relativa de todas estas técnicas en las granjas afectadas por RSFP resultó extremadamente baja (entre 30,3% y 70,8% según la prueba). En cuanto a las pruebas puestas a punto con antígeno citosólico, el ELISA-i resultó en una mediocre eficacia diagnóstica, ya que al seleccionar el punto de corte necesario para obtener 100% de Sp, la Se resultante fue muy baja (45%). La CIE también proporcionó una Se muy baja (41,4%) cuando la lectura se realizó a las 3h, si bien aumentó en la lectura realizada a las 24h, resultando en un valor similar (Se = 66.3%) al obtenido en la DG (67,5% y 68,8 %, con citosol y S-LPS, respectivamente) y en la FC. Sin embargo, la DG con S-LPS resultó poco específica en granjas con RSFP, a diferencia de la CIE y DG con antígeno citosólico, que resultaron 100% específicas frente a todos los sueros afectados por RSFP. Aunque la Se diagnóstica de estas dos últimas pruebas no puede considerarse del todo satisfactoria a nivel individual, podrían ser muy útiles a nivel de granja para interpretar las RFSP en porcino, algo que solo podía hacerse hasta ahora mediante la prueba intradérmica con brucelina (Dieste *et al.* 2011).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Blasco, J. M. *et al.*, 1994. J Clin Microbiol. 32: 1835-1840 •Cloeckeaert, A. *et al.*, 1992. J. Gen. Microbiol. 138: 1211-1219 •Dieste, L. *et al.*, 2011. Brucellosis 2011, International Research Conference (abstract) •EFSA 2009 1144 64-112 •Garin Bastuji, B. *et al.*, 2000. No. 38: 1-5 •Godfroid, J. *et al.*, 2002. Vet Microbiol 90: 135-145 •Monreal, D. *et al.*, 2003. Infect. Immun. 71: 3261-3271 •Munoz, P. *et al.*, 2003. X Jornadas sobre Produccion Animal 417 - 419 •Muñoz, P. M. *et al.*, 2012. Vet. Immunol. Immunopathol. 146: 150-158 •Muñoz, P. M. *et al.*, 2010. 10: •Muñoz, P. M. *et al.*, 2005. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 141-151 •OIE, 2012. Oie Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2, 7th chapter 2.8.5

•**Agradecimientos:** A los veterinarios de las explotaciones colaboradoras y a las técnicas de laboratorio Sara Serrano y María Uriarte. Experiencia financiada por INIA (RTA2011-00103) y Gobierno de Aragón (Grupo Consolidado Brucellosis y beca predoctoral de L. Dieste).

Tabla 1. Sensibilidad (Se) y Especificidad (Sp) de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis porcina. Para calcular la Se y Sp se usaron, respectivamente, 169 sueros de cerdos cultivo positivo y 423 sueros de cerdos libres de Brucellosis. La Sp relativa de todas las pruebas se calculó también usando 185 sueros de granjas afectadas por RSFP. Los valores se expresan como porcentaje y sus intervalos de confianza (95%), entre paréntesis.

Prueba serológica	Se	Sp	Sp relativa (RSFP)
RBm	98,2 (96,2 - 100)	90,3 (87,5 - 93,1)	30,3 (23,6 - 36,9)
RBst	93,5 (89,8 - 97,2)	99,1 (98,1 - 100)	60,0 (52,9 - 67,1)
FC	72,2 (65,4 - 78,9)	100 (99,1 - 100)	70,8 (64,3 - 77,4)
ELISA-i IB Porcine	95,9 (91,6- 98,3)	100 (99,1 - 100)	31,4 (24,7 - 38,0)
DG/S-LPS	68 (61,0 - 75,1)	100 (99,1 - 100)	93,0 (89,3 - 96,7)
DG/Citosol	67,5 (60,4 -74,5)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)
CIE 3h	42 (34.6 - 49.5)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)
24h	66,9 (59,8 -74,0)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)
ELISA-i / Citosol	45,3 (36,9 - 54,0)	100 (99,1 - 100)	100 (98,4 - 100)

PERFORMANCE OF SEVERAL SEROLOGICAL TESTS FOR DIAGNOSING SWINE BRUCELLOSIS

ABSTRACT: The S-LPS based serological tests (RB, FC and i-ELISA) used routinely for diagnosing swine brucellosis do not discriminate the immunological responses due to brucellosis from FPSR due to infections caused by other bacteria like *Y. enterocolitica* O:9. Gel Diffusion (GD), Counterimmunoelectrophoresis (CIE) and i-ELISA tests using an O-polysaccharide free cytosolic extract obtained from *B. abortus* manB_{core} were developed and evaluated to discriminate brucellosis from FPSR. A total of 169 sera from culture positive sows, 423 sera from brucellosis free sows and 185 sera from sows belonging to FPSR affected farms were used for evaluation. The i-ELISA with cytosolic antigen was resulting in very low diagnostic performance. By contrast, GD and CIE with the same cytosolic extract resulted in moderate diagnostic sensitivity (67.5% and 66.9%, respectively) but being simultaneously 100% specific in both brucellosis free farms and farms affected by FPSR, offering then a practical alternative to the brucellin skin test to discriminate brucellosis from the FPSR at herd level.

Keywords: serodiagnosis, swine, *Brucella suis* biovar 2, brucellin.