

# DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ELISA IGG

J. Lottersberger (1), R. Pauli (2) y N.B. Vanasco (3). 2004.

(1)Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe.

(2)Laboratorio Alfa, Cañada de Gómez, Santa Fe.

(3)Inst. Nac. de Enfermedades Respiratorias "E. Coni", Santa Fe.

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Enfermedades de la reproducción](#)

## RESUMEN

Las pruebas serológicas oficiales para el diagnóstico de brucelosis en nuestro país son BPA, SAT y SAT-2ME. Estas pruebas requieren una alta carga laboral y su lectura es subjetiva. La OIE recomienda el uso de la FC o del ELISA, más sensibles y específicas. Por lo tanto, el desarrollo de un ELISA para brucelosis, accesible para cualquier tipo de laboratorio de diagnóstico y desarrollado totalmente en el país, sería una herramienta importantísima para el diagnóstico de esta enfermedad.

**Palabras clave:** Bovino, vaca, brucelosis, diagnóstico, anticuerpos, serología, hato lechero, sensibilidad, especificidad, laboratorio.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una infección causada por una bacteria, la *Brucella abortus*, que puede ser responsable de abortos en vacas. La infección natural o experimental con cepas de *Brucella abortus* virulentas va seguida de la formación de anticuerpos tipo IgM e IgG, pero el título de anticuerpos tipo IgM declina rápidamente, mientras que el título de IgG tiende a permanecer alto mientras el animal esté infectado. En animales con infección crónica la IgG es la inmunoglobulina principal y muchas veces es el único anticuerpo detectable.

En nuestro país los rodeos de vacas lecheras son sometidos a estudios periódicos para determinar su estado sanitario utilizando técnicas serológicas. Para evitar la interferencia de anticuerpos vacunales en el diagnóstico de los animales adultos, las hembras jóvenes se vacunan entre los 3 y 10 meses de edad y en el 95% de los casos estos anticuerpos desaparecen antes los 18 meses de edad.

Las pruebas serológicas oficiales en nuestro país son la seroaglutinación en tubo (SAT) y SAT con 2-mercaptoetanol (SAT-2ME), denominadas Pruebas Complementarias (PC), y se utilizan para el diagnóstico definitivo de sueros reactivos para la prueba de aglutinación a pH ácido (BPA). Estas PC requieren una alta carga laboral y su lectura es subjetiva. En caso de ser necesario confirmar un resultado, la técnica de referencia internacional es la Fijación del Complemento (FC). La OIE en su manual de estándares de 1996 (cap. 3.2.1.) sugiere que las pruebas complementarias son menos sensibles y específicas que otras pruebas serológicas (como FC o ELISA), por lo cual debería evitarse su uso en caso de disponer de estas otras pruebas.

Por lo tanto, la posibilidad de disponer de un reactivo ELISA para brucelosis accesible para cualquier tipo de laboratorio de diagnóstico y desarrollado totalmente en el país, sería una herramienta de mucha importancia para el diagnóstico serológico de la brucelosis.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y evaluar un enzoinmunoensayo en fase sólida (técnica ELISA) para la determinación de anticuerpos específicos IgG anti-*Brucella* en sueros bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El reactivo ELISA desarrollado utiliza antígenos de *Brucella abortus* (cepa 1119) inmovilizado sobre policubetas de poliestireno de 96 pocillos (COSTAR, en 12 tiras de 8 pocillos separables). Se incubaron 100ml de cada muestra diluida 1:200 en buffer proteico por 30 minutos a 37°C. Luego de cinco lavados se incubó un conjugado anti-IgG bovino con peroxidasa por 30 minutos a 37°C. La reacción se reveló utilizando el sistema cromogénico TMB/agua oxigenada, con lectura a 450/630nm. Se determinó la relación (REL) entre los valores de densidades ópticas (DO) obtenidas de las muestras individuales y las DO obtenidas de un pool de sueros negativos provenientes de un establecimiento libre de brucelosis. Los resultados fueron estudiados utilizando el programa MedCalc®, para determinar el valor de corte (cut-off) del ensayo y parámetros estadísticos.

Para este estudio se procesaron en total 1878 sueros bovinos evaluados por BPA, PC y FC y agrupados en dos paneles. El panel n° 1 estaba constituido por 1412 sueros evaluados por BPA y FC, de los cuales 1255 fueron negativos y 157 positivos. El segundo panel (n° 2) estaba constituido por 466 sueros evaluados por BPA y PC (SAT-2ME). En este ensayo se comparó la reactividad del ELISA frente a la reactividad de PC en su conjunto y frente a SAT-2ME.

## RESULTADOS

Frente a los 1412 sueros del panel nº 1, la sensibilidad obtenida fue del 99,4% y la especificidad del 99,0%, con un área bajo la curva ROC de 0,993 (IC= 0,987-0,997) con un valor de corte para el ensayo de REL=4. La concordancia entre FC-ELISA fue  $k=0,96$  ( $p<0,001$ ) (Figuras nº 1 y 2).

Figura 1: Curva ROC ELISA vs. Fijación de Complemento

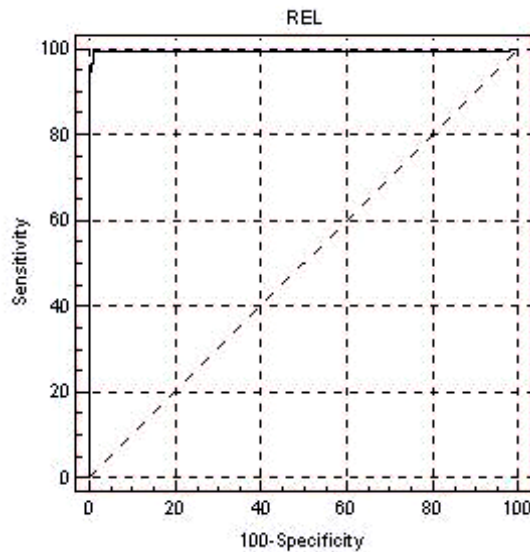
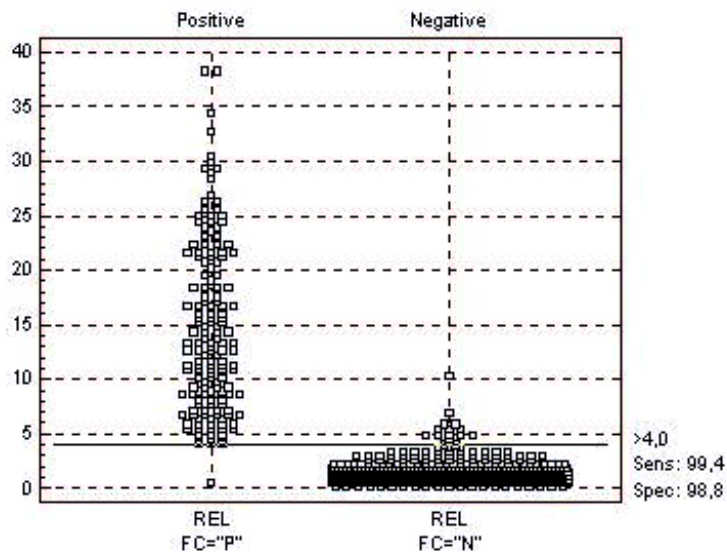


Figura 2: Frecuencia de muestras positivas y negativas para ELISA



Se procesó un segundo grupo de sueros (panel nº 2) de 466 sueros evaluados por BPA y PC (SAT + SAT-2ME), 262 positivos y 191 negativos, frente a los cuales la sensibilidad obtenida fue del 94,3% y una especificidad del 96,3%. 13 de los sueros del panel no pudieron ser clasificados por las PC.

Debido a esto, se comparó la reactividad del ELISA frente a la prueba del SAT-2ME. Con esta prueba, 258 muestras eran positivas y 208 negativas. Frente a SAT-2ME la sensibilidad obtenida fue del 95% y la especificidad del 94,2%. Las 18 muestras discordantes entre las dos técnicas evaluadas fueron confirmadas por FC obteniéndose los siguientes resultados: 9 muestras PC negativas, fueron positivas para FC y ELISA; 9 muestras PC positivas, fueron negativas para FC y ELISA (tabla nº 1).

Tabla nº 1: Resultado muestras discordantes entre ELISA y SAT-2ME.

	FC +; ELISA+	FC-; ELISA-
SAT-2ME +	0	9
SAT-2ME -	9	0

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran una alta sensibilidad y especificidad y una muy buena correlación de este ELISA con la FC para el diagnóstico de anticuerpos específicos anti-Brucella abortus en sueros bovinos.

Respecto de las técnicas de aglutinación utilizadas en el país (SAT, SAT-2ME) se observó una diferencia en los resultados obtenidos con estas técnicas interpretadas en conjunto o considerando solo SAT-2ME y los resultados de ELISA. Estos resultados mostraron que las PC arrojaron falsos resultados positivos y negativos, lo que hacen que si comparáramos la sensibilidad y especificidad de ELISA respecto de las PC, obtendríamos resultados erróneos. Estos resultados fueron confirmados por FC, y fueron coincidentes con los de ELISA.

Los resultados son concordantes con lo descrito en la bibliografía internacional y abonan lo sugerido por la OIE en sus estándares.

El reactivo ELISA desarrollado y evaluado en este trabajo podría ser utilizado para el diagnóstico serológico de brucelosis en rodeos lecheros, en reemplazo de las pruebas complementarias (SAT y SAT-2ME) utilizadas de rutina en los laboratorios veterinarios. La muy buena correlación entre este ELISA y FC, sumado a la rapidez, sencillez y objetividad de la técnica hacen que sea una herramienta muy útil para aplicar en los planes de control de Brucelosis, aumentando la confiabilidad del diagnóstico con una disminución en el tiempo y costos de operación.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Jacques, I.; Olivier-Bernardin V.; Dubray G. (1998). Efficacy of ELISA compared to conventional test (RBPT and CFT) for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. *Vet. Microbiol.* 64 (1): 61-73.
- 2.- Nielsen K.; P.F. Wright; W. Kelly; J. Cherwonogrodzky (1998). A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 18 (4): 331-47.
- 3.- OIE Manual of standards (1996) Chapter 3.2.1. Brucellosis. United States Department of Agriculture (USDA), National Veterinary Services Laboratory (NVSL), 1800 Dayton Road, Ames, Iowa 50010, USA.
- 4.- Saravi, M.A.; Wright, P.F.; Gregoret, R.J.; Gall, D.E. (1995). Comparative performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine Brucellosis in Argentina. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47:93-9.
- 5.- Vanzini V.R.; N. Aguirre; C.I. Lugaresi; S.T. Echaide; V.G. de Canavesio; A.A. Guglielmo; M.D. Marchesino; K. Nielsen. 36 (1998). Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 36:211-217.

[Volver a: Enfermedades de la reproducción](#)