



# XX REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

27, 28 y 29  
de noviembre de 2014  
Tucumán • Argentina

1984  
2014



30  
AÑOS



# EVALUACION DE UN KIT DE ELISA INDIRECTO PARA EL DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE *BRUCELLA OVIS*

Robles, C.A.; Chodilef, M.M.

Grupo de Salud Animal, INTA Bariloche. CC: 277 (8400) Bariloche - email: robles.carlos@inta.gob.ar

## Introducción

La brucelosis ovina es una enfermedad infecciosa de curso crónico producida por *Brucella ovis* (Buddle, 1956). A partir de que en nuestro país no hay una vacuna aprobada para prevenir la infección por este agente, el control de la enfermedad, se basa en la detección y descarte de los animales infectados. Para ello se utilizan técnicas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos contra el agente causal, como son la Inmunodifusión en gel de agar, la Fijación del complemento y el Elisa indirecto (Robles, 1998). El objetivo de este estudio, fue el de evaluar bajo condiciones epidemiológicas locales el comportamiento de un kit de Elisa indirecto comercial producido en el extranjero.

## Materiales y Métodos

Se utilizó una colección de 123 sueros positivos obtenidos de carneros infectados naturalmente con aislamiento de *Brucella ovis* del semen, sin serología previa, que fueron analizados por duplicado y 704 sueros negativos provenientes de establecimientos históricamente libres o que llevan como mínimo 3 años como negativos. La prueba se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente: sobre la microplaca de 96 pocillos, que viene con el antígeno pegado, se agregaron 100ul de los sueros problema diluidos 1:100 y 100ul de los sueros controles que ya vienen diluidos. Se incubó a 37°C por 60 minutos, sin agitar. Terminada la incubación se lavaron las placas 4 veces con solución de lavado. Se sembraron 100ul del conjugado por pocillo, se cubrió la placa y se incubó a 37°C por 30 min. Se lavaron las placas 6 veces con solución de lavado y se agregaron 100ul del sustrato-cromógeno a cada pocillo. Se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, tapando la placa con papel aluminio. Una vez completados los 10 minutos, se agregó sobre el sustrato-cromógeno, 100 ul de la solución de frenado. Dentro de los 5 minutos de agregada la solución de frenado se leyó la placa en espectrofotómetro con filtro de 450 nm. Para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba y determinar el punto de corte se utilizó la técnica de ROC curve (MedCalc, Ver 13.1). Todos los valores de densidad óptica (DO) obtenidos de cada suero en cada placa fueron transformados a porcentajes. Para ello el valor de la DO de cada suero se dividió por la DO del suero control positivo de la placa correspondiente y se multiplicó por 100.

## Resultados:

Sensibilidad y Especificidad del Kit: analizados el total de los sueros se obtuvo una sensibilidad del 98.37% y una especificidad del 99.29% tomando el punto de corte de 38%, resultante del análisis de ROC.

Repetibilidad y cálculo del Coeficiente de variación (CVar) de los controles positivo y negativo del KIT. En la siguiente tabla se presentan los valores promedio, desvío estándar y coeficiente de variación, que arrojaron los sueros controles positivo y negativo provistos en el Kit tras ser analizadas 11 microplacas.

Suero	Suma	Prom.	DE	CVar
Control (+)	26.563	2.415	0.319	13.23
Control (-)	0.631	0.057	0.002	3.09

Repetibilidad y cálculo del Coeficiente de variación de los sueros positivos evaluados: Los 123 sueros de la colección de positivos, arrojaron una densidad óptica (DO) promedio de 2.581, con un desvío estándar promedio de 0.08 y un coeficiente de variación promedio de 3.42.

## Discusión

La ejecución de la prueba resultó sencilla, tanto para la evaluación de unos pocos sueros en una tira, como para su utilización a placa completa. Usando el punto de corte de 30% sugerido por el fabricante, se obtiene una sensibilidad del 98.37% y una especificidad del 97.58%, mientras que aplicando el punto de corte de 38% que surge de este estudio, si bien se mantienen los valores de la sensibilidad, mejoró la especificidad, obteniendo valores comparables a otros test de Elisa comerciales y artesanales en uso (Marin y col, 1989; Gall y col, 2003). El CVar del suero control negativo fue bueno, sin embargo el CVar para el suero control positivo fue un tanto alto, por lo que habría que analizar en profundidad el comportamiento del mismo para determinar las posibles causas de este fenómeno y en todo caso evaluar el cambio del suero control del Kit. El CVar promedio obtenido con los 123 sueros positivos analizados, indica que el Kit tiene una buena repetibilidad intra placa por lo que no sería necesario analizar los sueros por duplicado en la rutina diaria de diagnóstico. Se concluye que el Kit demostró un funcionamiento correcto, sólido, con resultados claros al momento de la lectura, con un background muy bajo, lo que lo hace recomendable su uso para tareas de diagnóstico de rutina como para programas de control.

## Bibliografía

- Buddle, M.B. (1956) Studies on *Brucella ovis*, a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. The Journal of Hygiene, Vol 54 :351-364.
- Robles, C.A. (1998) Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. Rev. Med. Vet. Vol 79 (1):67-71.
- Gall, D.; Nielsen, K.; Vigliocco, A.; Smith, P.; Prez, B.; Rojas, X.; Robles, C. (2003) Evaluation of an indirect Enzyme-linked Immunoassay for the presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Small Ruminants Research. 48: 173-179.
- Marin, C. M.; Jimenez de bagues, M.P.; Blasco, J.M.; Gamazo, C.; Moriyon, I.; Diaz, R. (1989) Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. The Veterinary Record, 125:504-508.

**Financiación:** el presente trabajo fue financiado por el proyecto INTA PNSA 1115052 y por Inmunology S.A.