



**Asociación Argentina de
Veterinarios de Laboratorio de
Diagnóstico
I Congreso Nacional
XXIV Reunión Científico
Técnica**

**10 al 13 de septiembre de 2024
Mar del Plata, Buenos Aires, República
Argentina**

DOI: <https://doi.org/10.24215/15142590e089>

I-019-24. Estandarización y evaluación preliminar de un ELISA competitivo para el diagnóstico de la brucelosis en porcinos

Gutiérrez SE^{1,3}, Morán MC^{1,3}, Khun T¹, Sánchez F¹, Valentini B², Novoa B², Vanzini VR², Estein SM^{1,3}

1. Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (FCV, UNCPBA), Argentina
2. Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IDICaL), EEA Rafaela INTA-CONICET, provincia de Santa Fe, Argentina
3. Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) (UNCPBA, CICPBA, CONICET), Argentina

* silmares@vet.uncen.edu.ar

La brucelosis porcina es una enfermedad endémica y zoonótica cuyo agente etiológico es *Brucella suis*. Esta enfermedad limita las posibilidades económicas del sector y del comercio internacional ya que ocasiona abortos, muerte perinatal, infertilidad y lesiones osteoarticulares que impactan negativamente en la rentabilidad de las explotaciones y en la calidad de los productos y subproductos de origen animal. Además, es una zoonosis de notificación obligatoria con impacto en la Salud Pública que produce una enfermedad crónica y debilitante en las personas.

El diagnóstico de la brucelosis porcina se basa en la interpretación de los signos clínicos, en el análisis de la situación epidemiológica y en los resultados de las pruebas serológicas. Las pruebas serológicas que se emplean para el diagnóstico poblacional en el porcino incluyen las pruebas tamiz y las confirmatorias. Las primeras consisten en aglutinaciones con bacterias enteras y se denominan BPA (prueba en placa con antígeno tamponado) y RBT (prueba Rosa de Bengala). Las pruebas confirmatorias incluyen el ensayo de polarización de la luz fluorescente (FPA), la fijación de complemento (FC), y las técnicas de ELISA indirecto y competitivo (ELISAc). Es importante destacar que la mayoría de estas pruebas han sido estandarizadas inicialmente para la especie bovina, con sensibilidad y especificidad variables para la especie porcina. Las pruebas de aglutinación y FC detectan anticuerpos contra distintos componentes de la membrana externa, mientras que FPA y ELISAc sólo detectan anticuerpos dirigidos contra el polisacárido O, resultando por lo tanto más específicas.

El objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de un ensayo de un ELISA competitivo para detectar anticuerpos contra el LPS de *Brucella* en muestras de suero porcino, caracterizadas de acuerdo con su reactividad en las pruebas de BPA y FPA, y según el estatus epidemiológico de la piara.

Para la estandarización del ELISA se utilizó el antígeno lipopolisacárido liso (sLPS) de *B. abortus* cepa 1119-3 y el anticuerpo monoclonal (AcM) anti-sLPS (AcM D7) producidos en la EEA Rafaela-INTA. El sLPS se adsorbió en placas de poliestireno y se siguió el procedimiento validado para la especie bovina modificando la dilución de los sueros (1:5) y del anticuerpo monoclonal (1:300). En cada placa se incluyeron los siguientes controles: blanco (sin suero, sin AcM), control de reacción (sin suero, con AcM), control positivo fuerte y débil, y control negativo.

Todas las muestras y controles se ensayaron por duplicado. Los resultados se expresaron como % de bloqueo según la siguiente fórmula: % bloqueo= 100 – (densidad óptica muestra/densidad óptica control reacción)*100.

Para realizar una evaluación preliminar, una vez obtenidas las condiciones óptimas del ensayo, se analizaron un total de 242 muestras de porcinos, incluyendo 162 muestras provenientes de 2 establecimientos con certificación negativa (con resultado negativo en BPA y FPA) y 80 muestras positivas a BPA y FPA provenientes de criaderos con antecedentes clínicos o serológicos de infección. Los resultados se analizaron mediante un ROC (*receiver operator characteristic*) utilizando el programa Epitools (<https://epitools.ausvet.com.au/roccurves>). A continuación, se analizó la reactividad en el ELISAc de un panel de sueros seleccionados (n=53) incluyendo sueros con serología (BPA, RBT y FPA) negativa de animales pertenecientes a establecimientos positivos a la infección, y sueros con resultado discrepante entre las técnicas de BPA y FPA.

Durante la etapa de optimización, se observó que el conjugado (Ac anti-ratón peroxidasa) (Jackson ImmunoResearch Inc., USA) se unía en forma inespecífica a los anticuerpos porcinos unidos al sLPS en el primer paso del ensayo, por lo cual fue necesario agregar 3% de suero porcino (negativo a brucelosis) al diluyente del conjugado para adsorber la reactividad inespecífica. El análisis ROC mostró un área bajo la curva= 0,988 (95% IC: 0,972-1). El punto de corte correspondiente a 41,6% de bloqueo, determinó una sensibilidad de 96,3% (95% IC 89,5% - 98,7%) y una especificidad de 100% (95% IC 97,7% - 100%). Treinta y siete de 38 sueros negativos en aglutinaciones rápidas (BPA y RBT) y FPA provenientes de establecimientos que tenían animales infectados fueron también negativos en ELISAc, mientras que uno de ellos fue positivo (54,45 % bloqueo). Respecto de las muestras con resultado discrepante entre las aglutinaciones y FPA, 10/13 sueros negativos en BPA/RBT pero positivos en FPA, fueron negativos en ELISAc, mientras que los 3 restantes fueron positivos. Dos muestras positivas en BPA/RBT pero negativas en FPA resultaron positivas en ELISAc (47 – 52% bloqueo).

La evaluación preliminar del ELISAc que detecta anticuerpos contra el polisacárido O de *B. abortus* evidencia una alta especificidad y sensibilidad para la detección de porcinos infectados. El análisis de muestras con resultado discrepante indicaría mayor especificidad y sensibilidad en comparación a la prueba de FPA. Esta evaluación preliminar, sumada a las propiedades de la prueba (objetividad de los resultados, automatización y capacidad de procesar gran número de muestras) y teniendo en cuenta que emplea reactivos producidos en el país, la posicionan como un excelente candidato para el diagnóstico de la brucelosis porcina a nivel individual.

Nicola AM, Elena S, Franco C. 2019. Brucelosis: Manual de Diagnóstico Serológico (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*). Versión 4.0/2019. (SENASA, ed.). SENASA. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_tecnicas_serologicas-2019-v4_brucelosis.pdf [Consultado 15/06/2024]

Novoa MB, Aguirre N, Torioni de Echaide S, Valentini B, Vanzini V.2021.Desarrollo de un ELISA de inhibición competitivo para el diagnóstico de la brucelosis en bovinos, resultados preliminares. XXIII Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Modalidad virtual, p.85.