



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias
Especialización en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario
Cohorte 2020**

TRABAJO FINAL

Diagnóstico inmunológico de brucelosis en muestras de leche, estudio de concordancia entre las pruebas de anillo en leche (PAL) y ELISA indirecto.

**Estudiante: MV Federico Bonetto
Director: Dr Eduardo Mortola
Codirector: Msc Graciela Miceli**

Índice

Portada	1
Resumen y Palabras claves.....	3
Introducción.....	4
Hipótesis.....	6
Objetivos.....	7
Materiales y métodos.....	7
Resultados.....	20
Discusión y conclusiones.....	21
Bibliografía.....	22
Anexo.....	25

Resumen

La Brucelosis Bovina es una enfermedad infecciosa limitante del desarrollo ganadero. Por ello se deben considerar estrategias para la eliminación de la enfermedad en los rodeos e implementar un sistema de vigilancia. En el ganado lechero, las herramientas disponibles para controlar periódicamente si los rodeos o áreas libres de brucelosis mantienen esa condición, son la Prueba de Anillo en leche (PAL) y ELISA indirecto (ELISA I). PAL detecta anticuerpos aglutinantes anti-brucela frente a la fracción O de la cadena de lipopolisacáridos de la membrana externa de *Brucella* spp; mientras que ELISA I detecta anticuerpos IgG específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* en muestras de leche de bovinos. El objetivo de este trabajo fue comparar las mencionadas pruebas para establecer su concordancia, con la finalidad de determinar el estado sanitario de los rodeos, en una estrategia de vigilancia epidemiológica de la enfermedad en los rebaños. Para tal fin, se sometieron a dichas pruebas 206 muestras de leche de tanque, obtenidas de 20 rodeos de establecimientos de Villa María, Córdoba. En este estudio, la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en muestras de leche mediante PAL y ELISA I fueron 10,2% y 28,6% respectivamente. El ensayo de ELISA I detectó 59 muestras de leche positivas, mientras que PAL 26 muestras como positivas. Sin embargo, en la prueba de ELISA I, 48 muestras resultaron indeterminadas. Comparando las características operativas de PAL contra el ELISAI, la sensibilidad y la especificidad de la prueba de PAL fue 40,7% y 100% respectivamente. El valor de concordancia kappa entre estas pruebas fue de 0,495, lo que resultó en resultados moderados. Los resultados informados indican que el ELISA I utilizado para analizar las muestras de leche a granel fue más sensible que el PAL, un atributo de ensayo deseable para un programa de vigilancia.

Palabras claves: Brucelosis, Diagnóstico, Elisa indirecto, Prueba de anillo en leche.

Introducción

La Brucelosis Bovina es una enfermedad infecciosa limitante del desarrollo ganadero. Se encuentra ubicada en la lista B de la OIE (OIE, 2003) donde se enumeran enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables (Mederos et al., 1981). Por ello se deben considerar estrategias para la eliminación de la enfermedad en los rodeos e implementar un sistema de vigilancia que permita analizar la evolución del programa y a la vez detectar de forma precoz el ingreso de la enfermedad en los rodeos libres.

Dentro de las características microbiológicas de la *Brucella* spp., hay que destacar la presencia de LPS., que normalmente corresponde a un 3% del peso seco de la bacteria, que está compuesto por el polisacárido O, el núcleo y el lípido A (Freer et al., 2001). La importancia de dicha estructura se debe a que nos permite detectar la presencia de la bacteria a partir de pruebas diagnósticas, la detección de anticuerpos antipolisacárido O es indicativo de infección por *Brucella* spp.

Debido al alto impacto económico de la enfermedad en la producción y sanidad animal y al riesgo, por ser una enfermedad zoonótica, de transmisión a la población humana, la mayoría de los países han implementado programas para el control y/o erradicación de la brucelosis en el ganado (Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, 2022). La brucelosis en humanos puede ser debilitante e incapacitante y constituye un importante problema de salud pública (Morán, 2013). En ausencia de una vacuna contra la brucelosis humana, la prevención de la enfermedad depende principalmente del control de la brucelosis en los animales que constituyen el reservorio natural de la enfermedad (Morán, 2013). El control de la brucelosis bovina depende de la vacunación, como así también de la detección y aislamiento de los animales infectados (Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina-SENASA, 2021). El diagnóstico confirmatorio de brucelosis se realiza en forma directa mediante el aislamiento del microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Debido al crecimiento lento de *Brucella* spp a partir de 4 cultivos primarios (puede ser hasta

7 días), el riesgo involucrado en su manejo y la baja sensibilidad del aislamiento bacteriológico, determinan que el diagnóstico basado exclusivamente en el aislamiento no siempre sea factible y eficaz. Por este motivo el diagnóstico de laboratorio de brucelosis bovina se basa principalmente en el diagnóstico serológico mediante la detección de anticuerpos específicos contra el agente infeccioso en muestras de suero y/o leche (Nicola et al., 2019). En este sentido, es fundamental que el método serológico utilizado permita discriminar claramente los animales que han sido vacunados de aquellos naturalmente infectados, y de esta manera evitar el sacrificio innecesario de animales vacunados.

A fin de generalizar y homogeneizar las tareas de control y erradicación de esta enfermedad, el SENASA, a través de sus resoluciones (Resolución 276/2023 y RESOL-2023-276-APN-PRES#SENASA), reglamenta las acciones que deben realizarse a nivel país y que se apoyan en dos pilares fundamentales:

- a- Vacunación obligatoria de todas las terneras de reposición entre los 3 y 8 meses de edad, por única vez, con una dosis de la vacuna *Brucella abortus* cepa 19.
- b- Extracción de sangre para determinar la presencia de anticuerpos de *Brucella abortus* en las hembras mayores de 18 meses de edad y de machos mayores de 6 meses, en caso de venta de reproductores o movimientos con destino a exposiciones rurales o remates.

En 2019 entró en vigencia la Resolución 67/2019, que, entre otras acciones, establece la realización de la Determinación Obligatoria de Estatus Sanitario a Brucelosis (DOES), consistente en un diagnóstico serológico obligatorio por única vez a la totalidad de los animales susceptibles (vaquillonas, vacas y toros) de cada establecimiento con el fin de verificar la condición sanitaria de los rodeos.

El Diagnóstico Serológico para el Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina en la República Argentina, está conformado por las siguientes técnicas de diagnóstico:

Pruebas tamiz:

- I) Aglutinación Tamponada en Placa (BPA -Buffered Plate Antigen-) o Técnicas de Antígeno Buferado en Placa (BPA).

II) Enzimoimmunoensayos: ELISA I elaborado con antígenos completos de LPS.

Pruebas confirmatorias:

- I) Seroaglutinación en Tubo (SAT) y seroaglutinación en presencia de 2-Mercaptoetanol (2-ME).
- II) Polarización Fluorescente (FPA).
- III) Enzimoimmunoensayos: ELISA de competición (C-ELISA), de bloqueo, u otras plataformas elaboradas con antígenos que permitan detectar específica y exclusivamente anticuerpos dirigidos contra la cadena O del lipopolisacárido (LPS).
- IV) Fijación del Complemento (FCT). Se realiza solo en casos muy excepcionales y por laboratorios de referencia.

Pruebas de vigilancia epidemiológica en leche:

- I) Prueba del anillo en leche (PAL)
- II) Prueba de ELISA indirecto (ELISA I)

En el ganado lechero, las herramientas disponibles para controlar periódicamente si los rodeos o áreas libres de brucelosis mantienen esa condición son las dos mencionadas precedentemente (Manual VETLIS® *Brucella* Glyco-ELISA I Bovinos. Chemtest 2022), las cuales se realizan en muestras del total de un ordeño (MTO). Un resultado positivo constituye un diagnóstico presuntivo de la presencia de la enfermedad, lo cual debe ser confirmado por medio del análisis de muestras individuales. Mientras que un resultado negativo puede indicar ausencia de infección en la población (Nicola y col., 2019).

Hipótesis

Existe concordancia entre las pruebas de PAL y ELISA I en muestras de leche de rodeos de Villa María, Córdoba.

Objetivo general

Comparar dos pruebas de diagnóstico inmunológico de brucelosis: PAL y ELISA I para establecer su concordancia, en muestras de leche de rodeos lecheros de Villa María, Córdoba.

Objetivos específicos

- Realizar la Prueba de anillo en leche en las muestras de leche.
- Realizar la Prueba de ELISA I en muestras de leche.
- Análisis estadístico de los resultados de las pruebas.
- Apertura de algunos de los pools y análisis de sueros individuales de animales que resultaron negativos a PAL y positivos a ELISA I.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó sobre 206 muestras de leche de tanque y 8969 muestras sueros, obtenidas de 20 rodeos de establecimientos de Villa María, Córdoba, una de las cuencas lecheras más grande del país. Durante un período de 6 meses, se realizaron los análisis de las muestras en el laboratorio Labvima (Laboratorio Red de SENASA) de la ciudad de Villa María, Córdoba.

Las muestras de leche de tanque se sometieron a las pruebas de PAL y ELISA I, con el objetivo de determinar el estado sanitario del rodeo en una estrategia de vigilancia epidemiológica de la enfermedad en el rebaño. Las muestras fueron remitidas por los Veterinarios a cargo de dichos establecimientos, que realizaron el control de brucelosis siguiendo los lineamientos del Programa de Control y Erradicación de SENASA (Morán, 2013).

La Prueba de anillo en leche (PAL)

Esta prueba pertenece al grupo de pruebas indirectas empleadas en el diagnóstico presuntivo de la brucelosis bovina, dado que evidencia o detecta anticuerpos aglutinantes anti-brucela frente a la fracción O de la cadena de lipopolisacáridos de la membrana externa del agente etiológico (Acosta et al., 2010). Para el desarrollo de esta técnica se empleó el antígeno PAL provisto por SENASA

(Nro Serie: 044, Vto: 04/25). Estos anticuerpos reaccionan con el antígeno coloreado con hematoxilina formando un complejo anticuerpo-antígeno que queda adherido a la superficie de los glóbulos grasos y asciende con ellos a la superficie, formando una capa o un anillo de crema de color purpura azulada, y de intensidad variable de acuerdo con la reacción. Paralelamente, desaparece parcial o totalmente la tinción de la columna de leche. Si la muestra no contiene anticuerpos específicos, el antígeno no se fijará a los glóbulos grasos y permanecerá uniformemente distribuido, coloreando la columna de leche, mientras que la capa de crema forma un anillo de color blanco natural.

Sobre la ejecución del ensayo de PAL, las muestras de leche se deben mantener en refrigeración a una temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta que hayan transcurrido no menos de 24 horas desde su recolección (preferiblemente, 48 a 72 horas).

Las muestras no deben haber sido congeladas, calentadas, sometidas a agitación violenta ni conservadas durante más de 72 horas. (En nuestro estudio las muestras de leche y antígeno fueron llevadas a temperatura ambiente ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$) como mínimo unos 45-60 minutos previos a la realización del ensayo).

Mezclar cada muestra invirtiendo varias veces el recipiente (tubo o frasco).

Garantizar la homogenización del antígeno, agitando suavemente por inversión durante no menos de 10 minutos (No usar vortex).

Colocar 1 ml de la muestra en un tubo de vidrio 13 x 100mm o tubo de khan. La altura de la columna de leche en el tubo debe ser como mínimo de 25mm y agregar 30ul de antígeno a cada tubo. Mezclar bien invirtiendo el tubo varias veces, sin que se llegue a formar espuma. No debe quedar antígeno sobre las paredes. Incubar en estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante una hora.

Tabla 1. Lectura e interpretación de PAL

Resultado	Interpretación
-	Anillo de crema, blanco; columna de leche, azul.
+	Anillo de crema y columna de crema, del mismo color, o casi igual.
++	Anillo de crema de color más pronunciado que la columna de leche.

+++	Anillo de crema, azul oscuro; la columna de leche tiene aún un poco de color.
++++	Anillo de crema, azul oscuro, la columna de leche es blanca.

Cualquier grado de + debe interpretarse como Positivo.

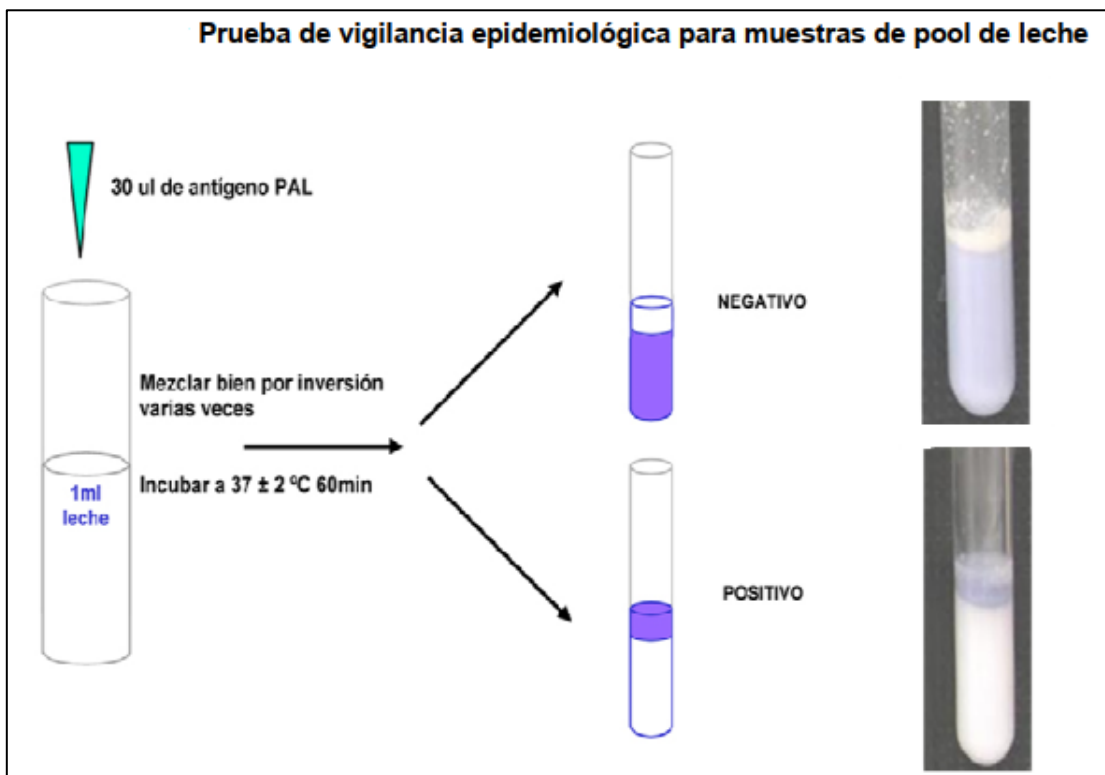


Figura 1: Comparación de resultados negativos y positivos de PAL.

Observaciones que se tienen en cuenta al momento de realizar el ensayo:

- El exceso o la escasez de crema dificultan la interpretación de la prueba.
- La agitación vigorosa dificulta la realización de la prueba.
- El calentamiento de la leche interfiere con los resultados; por lo tanto, la prueba no se debe efectuar en leches pasteurizadas.
- Cuando la prueba se efectúa el mismo día en que se ha recolectado la leche, se pueden obtener algunos resultados falsos positivos o dudosos.
- La leche de calostro puede dar resultados falsos positivos.

- Las leches de vacas con mastitis también pueden dar falsos positivos o impedir la interpretación de la prueba debido al descoloramiento del antígeno.
- Las leches de vacas próximas a secarse pueden dar resultados dudosos o falsos positivos.
- Hay vacas infectadas con *Brucella* spp que no eliminan anticuerpos por leche. Estas vacas son positivas a las pruebas de sangre y negativas en la prueba del anillo.

Prueba de ELISA I

Se empleó el kit de ELISA indirecto VETLIS® *Brucella* Glyco-ELISA I Bovinos, CHEMTEST™, Argentina. Esta prueba detecta anticuerpos IgG específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* en muestras de suero y leche de bovinos. Es un método diagnóstico que minimiza las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas y además permite diferenciar animales naturalmente infectados de aquellos vacunados con la cepa vacunal 19s (Manual VETLIS® *Brucella* Glyco-ELISA I Bovinos. Chemtest. 2022).

Los anticuerpos anti-polisacárido O constituyen un excelente marcador específico de infección brucélica. La detección exclusiva de esos anticuerpos permite confirmar el diagnóstico de la infección eliminando el riesgo de reacciones falso-positivas debido a reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos dirigidos contra epitopes comunes presentes en el lípido A y el core oligosacarídico del LPS de otras bacterias.

En este ensayo, las muestras de leche bovina son expuestas a pocillos recubiertos con el antígeno (glicoproteína recombinante purificada) de *Brucella abortus*. Si la muestra contiene anticuerpos anti-polisacárido O de *Brucella abortus*, estos se unen al antígeno del pocillo. Al añadir el conjugado, anticuerpos anti-IgG bovina conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos IgG unidos al pocillo. El material libre es eliminado mediante lavados antes de agregar la solución sustrato-cromógeno. El color azul que aparece es el

producto de la reacción del sustrato-cromógeno con el conjugado en aquellas muestras que resulten positivas. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con el antígeno. Cuanto mayor es el título de anticuerpos presentes en la muestra, más intenso es el desarrollo de color en los pocillos de ensayo. La reacción se detiene mediante el agregado de la solución de frenado y se observa un cambio de color al amarillo. La lectura de los resultados se realiza en un espectrofotómetro de microplacas midiendo la absorbancia a 450 nm.

Protocolo de ELISA I (Manual VETLIS® Brucella Glyco-ELISA I Bovinos. Chemtest. 2022):

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C). No retirar la placa de su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente. Si no se utiliza toda la placa, separar únicamente los strips de 8 pocillos necesarios para analizar los controles y las muestras. Guardar el resto de los strips, junto con los desecantes, en la bolsa de polietileno con cierre hermético incluida en el kit y volver a almacenar en el refrigerador (2-8°C). Nota: una vez abierto el envoltorio original de la placa, los strips se pueden conservar en la bolsa de polietileno **herméticamente** cerrada y en el refrigerador (2-8°C) hasta 90 días.
2. Agregar por duplicado 100 µl por pocillo del control positivo, control negativo y blanco de muestra.
3. Agregar 100 µl por pocillo de cada muestra de leche.
4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.
5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Nota: retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.
6. Agregar 100 µl de Conjugado a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.
7. Repetir el paso 5.

8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incubar con agitación orbital suave durante 10 minutos (±1 minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio). Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.

9. Detener la reacción agregando 100 µl de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa. La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. No es necesario realizar una lectura de blanco. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

En cuanto a la expresión de los resultados, se expresan como porcentaje de reactividad (PR) con respecto al control positivo (CP) incluido en cada ensayo (PRCP = 100%). Los valores de absorbancia medidos a 450 nm (Abs450) de cada muestra se relacionan con el valor de Abs450 del CP de la siguiente forma:

$$PR_{\text{Muestra}} = \frac{\text{Abs450 Muestra}}{\text{Promedio Abs450 CP}} \times 100$$

Para confirmar la validez del ensayo deben cumplirse los siguientes criterios:

- El valor del promedio de Abs450 del CP debe ser mayor a 1,8 (Promedio Abs450 CP >1,8).
- Los valores de Abs450 de los duplicados de los controles (CP y CN) y las muestras no deben diferir en más del 20% con respecto al promedio del duplicado.
- Los valores de Abs450 del Blanco de muestra (Blc Mtra) deben ser inferiores a 0,2 (Abs450 Blc Mtra <0,2).
- El valor promedio de la Abs450 del CN debe ser menor a 0,25 (Promedio Abs450 CN <0,25).

- La relación Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN debe ser mayor a 7,2 (Promedio Abs450 CP / Promedio Abs450 CN >7,2).

Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se puede considerar válida. En este caso la prueba debe repetirse.

Los resultados de las muestras deben interpretarse según Tabla 2

Tabla 2. Interpretación de resultados para la prueba de ELISA I

PR	Interpretación
≤14%	Negativo
>14% ≤ 24%	Indeterminado
<24%	Positivo

- ❖ Resultado negativo: cuando el PR es menor o igual al 14%.
- ❖ Resultado indeterminado: cuando el PR es mayor al 14% y menor o igual al 24%.
- ❖ Resultado positivo: cuando el PR es mayor al 24%.

En caso de obtener un resultado indeterminado la prueba se debe repetir. Si el resultado es todavía indeterminado, se recomienda ensayar una segunda muestra del animal obtenida después de un período de, por lo menos, 3 semanas. Si con la nueva muestra se obtiene nuevamente un resultado indeterminado, debería contemplarse la situación epidemiológica y analizar la muestra con otra técnica confirmatoria/complementaria.

Prueba de screening con antígeno tamponado en placa (BPA) para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp.

Es una prueba tamiz de aglutinación en placa. Se fundamenta en la inhibición de aglutininas inespecíficas a bajo pH. Detectan anticuerpos IgG y IgM específicos.

La ejecución de la prueba consiste en:

- Descongelar y mezclar bien los sueros utilizando vórtex.

- Llevar las muestras de suero y antígeno a temperatura ambiente ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$) como mínimo unos 40-60 minutos previos a la realización del ensayo.
- Garantizar la homogenización del antígeno, agitando suavemente por inversión durante no menos de 10 minutos (No utilizar vórtex).
- Colocar la placa de vidrio (Limpia y seca) sobre el aglutinoscopio.
- Con una micropipeta automática apoyada sobre la placa de vidrio, se depositan $8\mu\text{l}$ de suero. Utilizar un tip por cada suero.
- Con micropipeta descargar $30\mu\text{l}$ de antígeno próximo a la gota del suero, con la precaución de no tocar el suero para no contaminar con el tip el frasco de antígeno.
- Mezclar bien, con mezclador de alambre o acrílico, el suero con el antígeno abarcando una superficie circular aproximada de 3 cm de diámetro.
- Se retira la placa de vidrio y se imprimen 3 movimientos en forma rotativa hasta homogeneizar la mezcla.
- Se coloca la placa sobre el aglutinoscopio y se tapa, permaneciendo la luz apagada.
- Se efectúa una nueva rotación, pasados 4 minutos (se repite lo indicado en el punto 5).
- A los 8 minutos totales, rotando de nuevo la placa y con la luz encendida, se procede a la lectura.

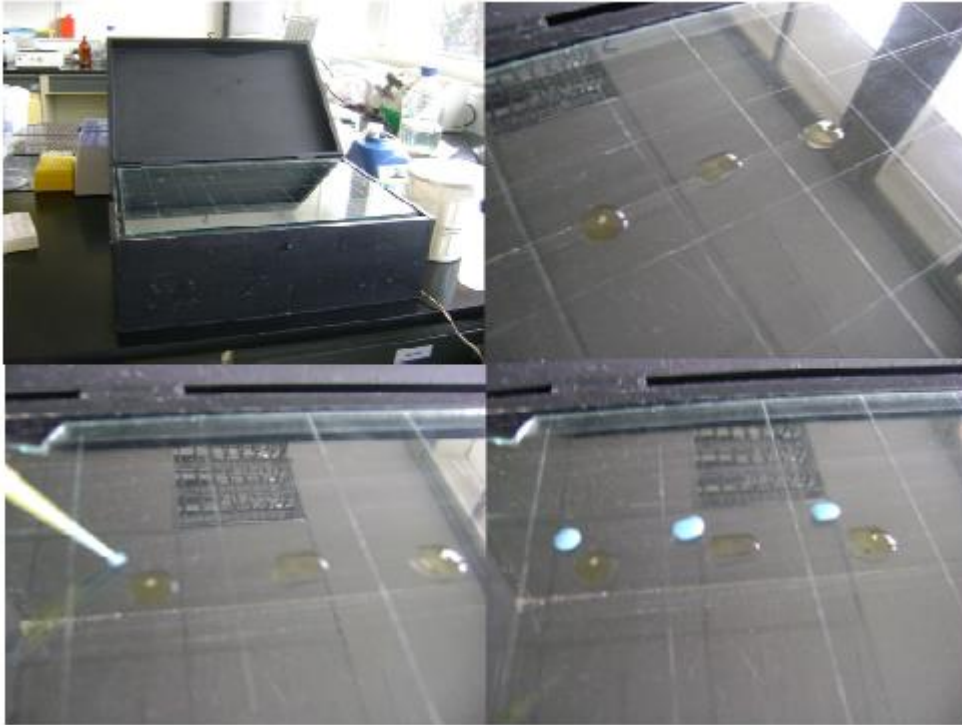


Figura 2: Aglutinoscopio con muestra de suero y antígeno

La lectura e interpretación de resultados/reacciones se llevan adelante de la siguiente manera:

POSITIVAS: Cuando se forman grumos, aun siendo finos (no confundir con artefactos producidos por impurezas, hemólisis, etc.). Estas muestras deben someterse a las pruebas confirmatorias de prueba de aglutinación estándar (SAT) y 2 Mercaptoetanol (2 ME), FPA, ELISA o FC.

NEGATIVAS: Cuando la mezcla suero-antígeno es de turbidez homogénea y sin grumos. Estas muestras se informan como negativas y no se realizan las pruebas complementarias.

BPA



Figura 3: Lectura BPA, Resultado positivo y negativo.

Prueba de polarización fluorescente (FPA) para la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp en suero (Nicola y col., 2019).

El ensayo de Polarización Fluorescente (FPA) para la detección de anticuerpos contra *Brucella* lisas tiene la capacidad de ser una prueba multi-especies, permitiendo el diagnóstico presuntivo en bovinos, porcinos, caprinos, ovinos, ciervos y bisontes.

Este ensayo validado para bovinos, si bien no diferencia animales vacunados de infectados, tiene la capacidad que aproximadamente a partir de los 3 meses post vacunación, los anticuerpos vacunales no son detectados y por lo tanto la presencia de anticuerpos luego de este tiempo, serian anticuerpos producto de una infección, Las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas son minimizadas en más del 90% de los casos.

A diferencia de los enzimoimmunoensayos, el FPA es un ensayo homogéneo que no requiere la necesidad de varias etapas de lavado. Los reactivos son agregados secuencialmente en solución y el tiempo total de la prueba no excede los 5 minutos para cada muestra. En resumen, la prueba involucra la adición de una determinada cantidad de suero a una solución tampón de dilución en un tubo de vidrio. A continuación, la muestra es equilibrada por aproximadamente cinco minutos,

posteriormente se realiza una primera lectura en el analizador fluorescente para obtener una lectura blanco de referencia (auto fluorescente). A continuación, el antígeno conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es agregado a la solución y luego, la muestra es equilibrada nuevamente por un mínimo de dos minutos para permitir que el antígeno y el anticuerpo interactúen, a continuación, la muestra es leída nuevamente en el polarizador. Si anticuerpos específicos contra *Brucella spp* están presente (suero positivo), el resultado será un valor alto de unidades de mili polarización (mP). En ausencia de anticuerpos anti *Brucella spp* (suero negativo), el resultado es un valor bajo en mP.

El valor de corte para bovinos en la República Argentina se ha determinado en:

- Animales negativos < 94 mP.
- Animales sospechosos: Los valores entre 94 mP y 104 mP.
- Animales positivos: valores igual o mayor a 105 mP.

Para la realización del ensayo se requiere:

- Analizador de Polarización Fluorescente.
- Vórtex.
- Micropipetas monocanal de volumen variable (0,1- 10µl, 20-200µl, 200-1000µl).
- Heladera (5 ± 3 °C) y freezer (-20 ± 5 °C).
- Tubos de vidrio: Tubos de borisilicato de 10 x 75 mm.
- Reactivos (están incluidos en los kits comerciales AUTORIZADOS por el SENASA), que incluyen (Buffer de dilución, sueros controles positivo y negativo; y antígeno marcado con isotiocianato de fluoresceína)



Figura 4: Analizador de Polarización Fluorescente.

La ejecución de la prueba consiste en preparar y analizar los sueros controles, siguiendo con lo especificado en los puntos indicados a continuación. Si el valor de mP de los sueros controles no se ajusta dentro de los límites especificados, el ensayo debe ser rechazado. Dejar a temperatura ambiente los reactivos, sueros controles y problemas por lo menos 2 h. antes de su uso. Se debe controlar y registrar en la planilla de trabajo la temperatura ambiente al momento del ensayo.

Encender el equipo, para **bovinos dispensar 990 μ l** de la solución tampón de dilución de sueros en los tubos de vidrio de borosilicato (10x 75mm). Dispensar **10 μ l de suero bovino** (Dilución 1/100) a analizar dentro de los tubos y mezclar bien con vórtex evitando la formación de espuma. Esperar como mínimo cinco minutos a que la solución suero-Buffer se estabilice. Continuado el período de equilibrio, realizar la lectura blanco de las muestras. Dispensar 10 μ l de antígeno conjugado con FITC determinado en cada tubo y mezclar bien con vórtex.

Es importante evitar la formación de espuma en la muestra. En caso de que el suero se vea contaminado con partículas en suspensión, dejar el suero equilibrarse por lo menos 10 minutos para asegurarse que estas partículas hayan sedimentado o centrifugar el mismo. Las partículas inespecíficas pueden interferir con la lectura de la muestra dado que, la misma se basa en el Peso Molecular de las partículas en suspensión. Dejar que la muestra y el antígeno se equilibren por lo

menos por dos minutos. Leer las muestras exactamente en el mismo orden que fueron blanqueadas.

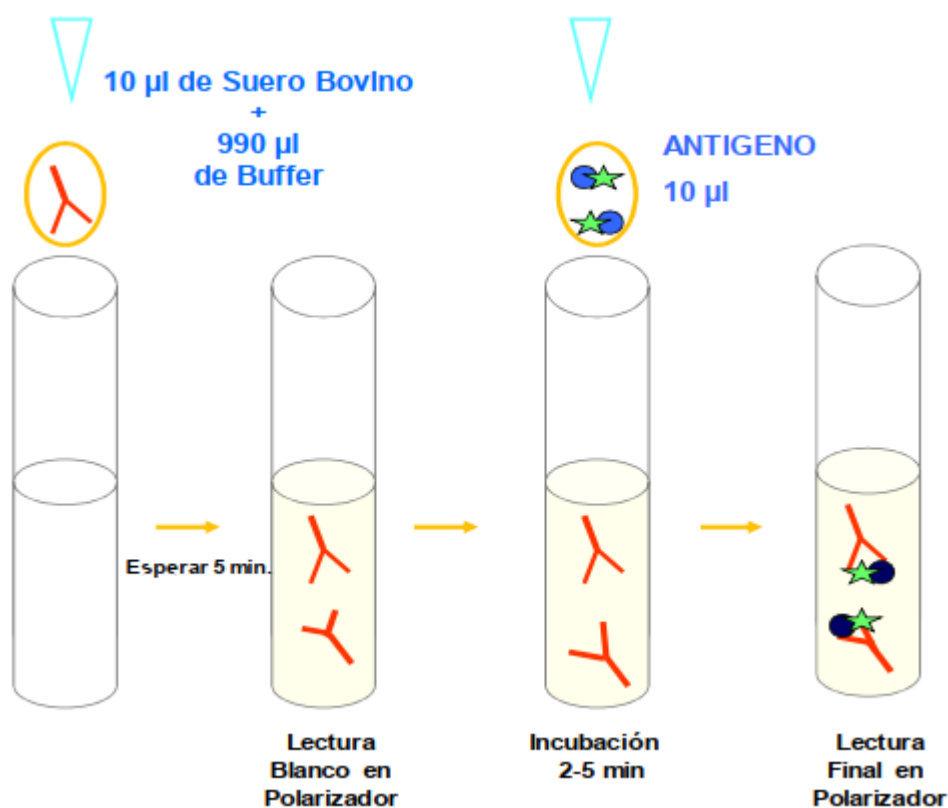


Figura 5: Esquema ensayo polarización fluorescente.

En cuanto a la interpretación de los resultados, los sueros controles del ensayo deben estar dentro de los límites especificados por el fabricante del kit utilizado según el control de calidad desarrollados durante la estandarización, optimización e implementación del ensayo. Los resultados de los sueros controles y problemas son expresados en unidades de mili polarización (mP) de la actividad del suero contra el antígeno.

Dependiendo de los valores que arrojen las muestras van a ser muestras negativas, sospechosas o positivas teniendo en cuenta los valores de corte para bovinos en la República Argentina que establece SENASA (Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina-SENASA. Resolución 77/2021).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis exploratorio mediante EpiInfo V.7.01, de las muestras obtenidas de los rodeos lecheros de Villa María, Córdoba, para establecer si hubo concordancia entre las pruebas de vigilancia epidemiológica de brucelosis empleadas en este estudio.

Resultados

En este estudio, la prevalencia de anticuerpos contra *Brucella* spp en muestras de leche mediante PAL y ELISA I fueron 10,2% y 28,6% respectivamente. Los pools de muestras de leche extraídas de los tanques de cada rebaño y sometidas a las técnicas de PAL y ELISA I arrojaron los siguientes resultados: El ensayo de ELISA I detectó 59 muestras de leche positivas, mientras que PAL detectó 26 muestras positivas, indicando una más alta sensibilidad del ELISA I. Sin embargo, no debemos dejar de mencionar que, en la prueba de ELISA I, 48 muestras resultaron indeterminadas.

De los pools de leche que resultaron negativos a PAL y positivos a ELISA I, se realizó la apertura de algunos de los pools y se evaluaron los sueros de los animales individualmente por las técnicas de rutina que determina el protocolo de control del SENASA (BPA como tamiz y FPA como confirmatoria). De este análisis, resultó que, aunque en muy bajo porcentaje, se hallaron animales positivos a *Brucella* spp. en los rebaños positivos a ELISA I (Anexo I- Excell de datos).

Ningún rebaño resultó ser positivo a PAL y negativo serológicamente a ELISA I.

Comparando las características operativas de PAL contra el ELISA I, la sensibilidad y la especificidad de la prueba de PAL fue 40,7% y 100% respectivamente (Tabla III). El valor de concordancia kappa entre estas pruebas fue de 0,495, lo que resultó en resultados moderados (Tabla IV).

Prueba	ELISA I								
		Positivo	Negativo	Total	Sn (%)	Sp (%)	Valor kappa	ES kappa	IC95%
B PAL	Positivo	24	0	24			0,495	0,060	0,38 - 0,61
	Negativo	35	147	182	40,7	100			
Total		59	147	206					

Tabla III. **Comparación de PAL con ELISA I.** Sn: Sensibilidad, Sp: Especificidad, IC95%: Intervalo de confianza.

Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Tabla IV: Valoración del Índice Kappa

Discusión y conclusiones

Los resultados informados indican que el ELISA I utilizado para analizar las muestras de leche a granel fue más sensible que el PAL, un atributo de ensayo deseable para un programa de vigilancia. La especificidad de PAL fue, en este estudio, del 100%. La sensibilidad y la especificidad del ELISA I empleado es del 99,7% y 100% respectivamente (Manual VETLIS® *Brucella* Glyco-ELISA I Bovinos. Chemtest. 2022). La mayor sensibilidad observada del ELISA I podría explicarse por la dominancia fisiológica de IgG1 sobre IgA e IgM en la leche (Sandholm & Korhonen, 1995), así como por la mayor sensibilidad analítica de la prueba (Nielsen et al., 1996b; Bercovich & Taaijke, 1990); aunque estos resultados deberían corroborarse con estudios más recientes.

En contraposición a nuestros resultados, Nivedi (2014), informó una prevalencia más alta a PAL que a ELISA I (PAL 7,38% y ELISA I 6,04% respectivamente), aunque no establece el índice de concordancia entre ambas pruebas. Si embargo, Vanzini et al. (2001) reportan resultados congruentes con los hallados por nosotros, con un valor de kappa de 60,9%. Asimismo, otros autores Shafee et al. (2011); Mohamed (2015) y Kerkhofs et al. (1990), también informaron que el ELISA I de leche es más sensible que el PAL.

El ELISA I tiene la ventaja de poder automatizarse fácilmente, permitiendo el examen de un gran número de muestras y la lectura de la prueba es objetiva. Otra ventaja de ELISA I sobre el PAL es que el estado de las muestras no es muy importante; así es posible analizar muestras frescas, almacenadas refrigeradas con o sin conservante o congeladas (Nielsen et al., 1996a). Esto facilita la recolección de un gran número de muestras de leche a granel que podrían analizarse en un laboratorio de referencia para el seguimiento continuo de la epidemiología de la brucelosis bovina en una zona de erradicación. Consideramos que se debe revisar el uso de PAL para vigilancia. El tamaño cada vez mayor de los rebaños lecheros y el cambio de la recolección de leche de tarros a tanques más fríos podrían ser los factores probables de la menor sensibilidad observada de PAL en comparación con ELISA I.

Bibliografía

- 1) Acosta AM, Ortiz M. 2010. Prueba del anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de brucelosis bovina. Sitio Argentino de Producción Animal. https://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/54-anillo.pdf
- 2) Bercovich Z, Taaijke R. 1990. Enzyme immunoassay using mouse monoclonal anti-bovine antibodies for the detection of B. abortus antibodies in cow milk. Zentralbl Veterinarmed B. 37:753-9. doi: 10.1111/j.1439-0450.1990.tb01124.x.

- 3) Freer E, Castro-Arce R. 2001. *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. Revista Costarricense de Ciencias Médicas. 22(1-2):73-82. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_
- 4) Kerkhofs P, Bottom Y, Thiange P, DeKeyser P, Limet N. 1990. Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. Veterinary Microbiology. 24:73-80. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90052-W](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90052-W)
- 5) Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres OMSA. Cap.3.1.4. 2022. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
- 6) Manual VETLIS® *Brucella* Glyco-ELISA I Bovinos. Chemtest. 2022. <https://www.chemtest.net/docs/vetlis-bovinos-manual.pdf>
- 7) Mederos D, Rodríguez J, Rivero ME. 1981. Brucelosis. En: Patología Especial de los Animales Domésticos. Editorial Pueblo y Educación. Primera reimpresión. 206-31.
- 8) Mohamed H. 2015. The prevalence of Bovine Brucellosis Using Four Serological Tests in Khartoum State. M.Sc., thesis submitted to Graduate College, Khartoum.
- 9) Morán M. 2013. Dirección de Epidemiología, Ministerio Salud de la Nación. Guía para el equipo de salud. Enfermedades infecciosas Brucelosis, República Argentina.
- 10) Nicola AM, Elena S, Franco C. 2019. Brucelosis. Manual de Diagnóstico Serológico. SENASA. Version 4.0. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_tecnicas_serologicas-2019-v4_brucelosis.pdf
- 11) Nielsen K, Gall D, Kelly W, Vigliocco A, Henning D, Garcia M, 1996b. Immunoassay development. Application to Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canada, ISBN 0-662-24163-0. Mimeo pp. 246.
- 12) Nielsen K, Smith P, Gall D, Perez B, Cosma C, Mueller P, Trottier J, Cote G, Boag L, Bosse J. 1996a. Development and validation of an indirect enzyme

- immunoassay for detection of antibody to *B. abortus* in milk. *Veterinary Microbiology*. 52:165-73.
- 13) Nivedi M. 2014. National Institute of Veterinary Epidemiology and Disease Informatics, Annual report. Hebaal, Bangalore, pp. 42.
 - 14) OIE. Clasificación OIE de las enfermedades. 2003. En: OIE. Disponible: <https://www.woah.org/en/disease/brucellosis/>
 - 15) Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina-SENASA. Resolución 77/2021. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/240975/20210219>
 - 16) Sandholm M, Korhonen H. 1995. Mastitis. Antibacterial defense mechanisms of the udder. In: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S. (Eds.), *The Bovine Udder and Mastitis*. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, pp. 37-48.
 - 17) Shafee M, Rabbani M, Sheikh AA, Ahmad MD, Razzaq A. 2011. Prevalence of Bovine Brucellosis in Organized Dairy Farms, Using Milk ELISA, in Quetta City, Balochistan, Pakistan. *Veterinary Medicine Internal*. 24:2011:358950 doi: 10.4061/2011/358950.
 - 18) Vanzini VR, Aguirre NP, Valentini BS, Torioni de Echaide S, Lugaresi MD, Marchesino L, Nielsen K. 2001. Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Veterinary Microbiology*. 82:55-60.

ANEXO 1. Excell de datos

1-sep	Muestra Pool	PAL	Elisa	Esta columna expone solo aquellos Pools que se abrieron y fueron analizados para las pruebas confirmatorias	BPA+	FPA+
	T10	Negativa	Negativa			
	T7	Negativa	Positiva	574	3	3
	T16A	Negativa	Positiva			
	T15Viejo	Negativa	Negativa			
	T15Nuevo	Negativa	Negativa	814	2	0
	T5B	Negativa	Positiva			
	T5A	Negativa	Positiva	389	6	6
	T17	Negativa	Positiva	305	2	1
	T12A	Negativa	Positiva			
	T2B	Negativa	Negativa			
	T9	Negativa	Negativa			
	T6B	Negativa	Positiva			
	T3C	Negativa	Negativa			
	T3B	Negativa	Negativa			
	T3A	Negativa	Negativa	634	0	0
	T9B	Negativa	Negativa			
	T2A	Negativa	Negativa			
	T11	Negativa	Negativa			
	T14	Negativa	Negativa			
	T8	Negativa	Negativa			
	T17G	Negativa	Negativa			
	T4	Negativa	Negativa			
	T6A	Negativa	*			
	T14G	Negativa	Negativa			
	T16B	Negativa	*			
	T1	Negativa	Negativa			
	T18	Negativa	Negativa			
	T12B	Negativa	Positiva			
	T20	Negativa	*			
	260	Positiva	Positiva			
	233	Positiva	Positiva			
	72	Positiva	Positiva			
	38	Positiva	Positiva			
	13	Positiva	Positiva			

14-sep	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	1	Negativa	Negativa	452	0	0
	2A	Negativa	Negativa			
	2B	Negativa	Negativa			
	3	Negativa	Negativa			
	4A	Negativa	Negativa			
	4B	Negativa	Negativa			
	5A	Negativa	Negativa			
	5B	Negativa	Negativa			
	6A	Negativa	Negativa			
	6B	Negativa	Negativa			
	7	Negativa	*			
	8	Negativa	*			
	9A	Negativa	Negativa			
	9B	Negativa	Negativa			
	10	Negativa	Negativa			
	11	Negativa	Negativa			
	12	Negativa	Negativa			
	13A	Negativa	Negativa			
	13B	Negativa	Negativa			
	14	Negativa	Negativa			
	15N	Negativa	Negativa			
	15V	Negativa	*			
	16A	Negativa	Positiva			
	16B	Negativa	Positiva			
	17	Negativa	Negativa			
	18	Negativa	Negativa			
	19	Negativa	Negativa			
	20	Negativa	*			
	8280 (T1)	Negativa	Negativa			
	8403	Negativa	Negativa			
	8404	Negativa	Negativa			
	8405	Negativa	*			

6-sep	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA +	FPA +
	T2	Negativa	Positiva	710	1	1
	T16	Negativa	Positiva	450	17	10
	Tonelatto 7886	Negativa	Positiva	320	2	1
	Bertone 7963	Negativa	Positiva			

	Multiagro 17	Positiva	Positiva	1111	7	6
	Multiagro 27	Negativa	Positiva	1026	10	8
	Multiagro 54	Negativa	Positiva	967	4	4

5-oct	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	15N	Negativa	Negativa			
	6	Negativa	*			
	2A	Negativa	*			
	16A	Negativa	Positiva	441	14	11
	16B	Negativa	Positiva			
	10	Negativa	Negativa			
	1	Negativa	Negativa			
	12A	Negativa	Negativa			
	15V	Negativa	Negativa			
	9B	Negativa	Negativa			
	4A	Negativa	Negativa			
	19	Negativa	Negativa			
	7	Negativa	*			
	12B	Negativa	*			
	14	Negativa	Negativa			
	20	Negativa	*			
	11	Negativa	*			
	5A	Negativa	*			
	3A	Negativa	Negativa			
	13A	Negativa	Negativa			
	2B	Negativa	Negativa			
	8	Negativa	Negativa			
	9A	Negativa	Negativa			
	13B	Negativa	Negativa			
	3B	Negativa	Negativa			
	5B	Negativa	Negativa			
	4B	Negativa	Negativa			
	17A	Negativa	Negativa			
	18	Negativa	Negativa			
	8965-410	Negativa	Positiva			
	8965-32	Negativa	Negativa			
	8965-110	Negativa	Negativa			
	8965-260	Negativa	*			

	8965-223	Positiva	*			
	9079-1	Negativa	Negativa			
	9079-2	Negativa	Positiva			
	9049	Negativa	Negativa			
	9052	Negativa	Negativa			
	9058	Negativa	*			
	9020-374	Positiva	Positiva			
	9051-E	Positiva	Positiva			
	9051-T	Negativa	Positiva			
	8978	Negativa	Negativa			

20-oct	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	gili	Negativa	Negativa			
	pablo	Negativa	Negativa			
	9079-11	Negativa	Negativa			
	9079-22	Negativa	Positiva			
	10078/1	Positiva	Positiva			
	10078/2	Negativa	*			
	vivo	Negativa	Negativa			
	T14g	Negativa	Negativa			
	T8b	Negativa	Negativa			
	T2a	Negativa	Negativa			
	T13i	Negativa	*			

22-nov	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	9420-221(11)	Positiva	Positiva			
	10342/221	Negativa	*			
	10175/221	Positiva	*			
	10514/221	Negativa	Negativa			
	10513/221	Negativa	Negativa			
	10522/221	Negativa	Positiva			
	10376/221	Positiva	Positiva	334	4	4
	10445/221	Negativa	*			
	10401/221	Negativa	Negativa			
	10322/221	Negativa	Positiva			
	10300/221	Negativa	Negativa			
	10416/221	Negativa	*			
	10464/221	Negativa	*			

7-dic	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	10721/221	Negativa	Negativa			
	10722/221	Negativa	Negativa			
	10904/221	Negativa	Negativa			
	10797/221	Negativa	Negativa			
	10858/221	Negativa	Negativa			
	10792/221	Negativa	Negativa			
	10794/221	Negativa	Negativa			
	10793/221	Negativa	Negativa			
	10894/221	Negativa	Negativa			
	10732/221	Negativa	Positiva			
	10740/221	Negativa	Negativa			
	10931/221	Negativa	Negativa			
	10932/221	Negativa	Negativa			
	10933/221	Negativa	Negativa			
	10934/221	Negativa	Negativa			
	10935/221	Negativa	Negativa			
	10936/221	Negativa	Negativa			
	10937/221	Negativa	Negativa			
	11060/221	Negativa	Negativa			
	11059/221	Negativa	Negativa			
	11058/221	Negativa	Negativa			
	11026/221	Negativa	Negativa			
	11076/221	Negativa	Negativa			
	11077/221	Negativa	Negativa			

7-dic	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	11040(1)	Negativa	Negativa			
	2	Negativa	*			
	3	Negativa	*			
	4	Negativa	Negativa			
	5	Negativa	*			
	6	Negativa	Positiva			
	7	Negativa	*			
	8	Negativa	*			
	9	Negativa	*			
	10	Negativa	Negativa			
	11	Positiva	Positiva			
	12	Positiva	Positiva			
	13	Positiva	Positiva			

	14	Positiva	Positiva			
	15	Negativa	Positiva			
	16	Negativa	Negativa			
	17	Negativa	Negativa			
	18	Negativa	*			
	19	Negativa	Negativa			
	20	Negativa	Negativa			
	21	Positiva	Positiva			
	22	Negativa	Negativa			
	23	Negativa	Positiva			
	24	Positiva	Positiva			
	25	Negativa	Negativa			
	26	Negativa	Negativa			
	27	Negativa	Negativa			
	28	Negativa	Negativa			
	29	Negativa	Negativa			
	30	Negativa	Negativa			
	31	Negativa	Negativa			

7-dic	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestra	BPA+	FPA+
	11003(1)	Negativa	Negativa			
	2	Negativa	Negativa			
	3	Positiva	Positiva			
	4	Negativa	*			
	5	Negativa	Negativa			
	6	Negativa	*			
	7	Negativa	Negativa			
	8	Positiva	Positiva			
	9	Positiva	Positiva			
	10	Negativa	Positiva			
	11	Negativa	*			
	12	Negativa	Negativa			
	13	Positiva	Positiva			
	14	Negativa	*			
	15	Negativa	*			
	16	Negativa	Positiva			
	17	Negativa	*			
	18	Negativa	*			
	19	Negativa	*			
	20	Negativa	*			

	21	Positiva	Positiva			
	22	Negativa	Negativa			
	23	Negativa	Negativa			
	24	Negativa	*			
	25	Negativa	Negativa			
	26	Negativa	Negativa			
	27	Negativa	Negativa			

7-dic	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	11082(1)	Negativa	Negativa			
	2	Negativa	Negativa			
	3	Negativa	*			
	4	Negativa	Negativa			
	5	Negativa	Negativa			
	6	Negativa	Positiva			
	7	Negativa	Negativa			
	8	Negativa	*			
	9	Negativa	Negativa			
	10	Negativa	*			
	11	Negativa	Negativa			
	11005(1)	Negativa	Negativa			
	11005(2)	Negativa	Negativa			

28/12/2022	Muestra	PAL	Elisa	Cantidad de muestras	BPA+	FPA+
	11620/221	Negativa	Negativa			
	11597/221	Negativa	*			
	11619/221-1	Negativa	Negativa			
	2	Negativa	Negativa			
	3	Negativa	Negativa			
	4	Negativa	Negativa			
	5	Negativa	Negativa			
	6	Negativa	Negativa			
	7	Negativa	Negativa			
	8	Positiva	Positiva			
	11654/221	Negativa	Positiva			
	11615/221 (T)	Negativa	Positiva			
	11615/221 (e)	Positiva	Positiva			
	11688/221	Negativa	Positiva	442	3	2
	11678/221	Negativa	*			

	11677/221	Negativa	Positiva			
	11676/221	Negativa	Negativa			
	11674/221	Negativa	*			
	11675/221	Negativa	Negativa			