



ENSAYO DE VALIDACION DE LA PRUEBA DE FLUORESCENCIA POLARIZADA PARA EL EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE BRUCELOSIS BOVINA.

VALIDATION ASSAY OF FLUORESCENCE POLARIZATION TEST FOR BOVINE BRUCELOSIS SEROLOGICAL DIAGNOSIS.

Rivera, A⁽¹⁾; Pérez B.⁽¹⁾, Rojas X.⁽²⁾, Wojciechowski E.⁽³⁾, Pino, C.⁽³⁾. Nielsen K.⁽⁴⁾.

(1). Servicio Agrícola y Ganadero. Tucapel 140. Puerto Montt. Chile.(2). Facultad de Ciencias. Instituto de Microbiología. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.(3) Colon 167 Pto Varas Chile (4)Animal Disease Research Institute, 3851.Fallowfield Road. Ont. Canada. K2H 8P9.

INTRODUCCION: Los ensayos de Fluorescencia Polarizada (FP) han demostrado una gran utilidad en la detección de enfermedades infecciosas. El formato del ensayo es homogéneo lo que permite resultados rápidos (Nielsen 2002). El principio de la prueba es que si una molécula, etiquetada con un marcador fluorescente, es excitada por una luz polarizada plana a una determinada longitud de onda, esta rotará y lo hará a una tasa inversamente proporcional a su tamaño. En el diagnóstico serológico de brucelosis bovina, han sido desarrollados y validados ensayos de FP en bovinos, cerdos, ovinos, caprinos, bisontes y ciervos (Nielsen y Gall, 2001), y ha sido aceptada por la OIE como prueba serológica alternativa para el diagnóstico de la brucelosis bovina y porcina, siendo su rendimiento comparable o mejor a la fijación de Complemento (OIE Manual 2000). En ensayos de validación en sueros de bovinos realizados en Argentina, se han observado valores de Sensibilidad de un 98,1% y Especificidad de 99,6% con un valor de corte de 87 milipolarizaciones (mP) (Samartino et al 1999), mientras que en México se ha observado un 99,0% de Sensibilidad y un 96,9% de Especificidad con un valor de corte de 90 mP (Dajer et al, 1999). En Canadá, se han encontrado valores de Sensibilidad entre un 99,0 y 100% y de especificidad de un 100% (Nielsen, 2002).

Objetivo: Con base a muestras provenientes de bovinos de la Décima Región, se efectuó una validación de la prueba de fluorescencia polarizada para el diagnóstico serológico de brucelosis.

MATERIAL Y METODOS: Poblaciones bovinas provenientes de rebaños infectados y poblaciones indemnes provenientes de rebaños libres de Brucelosis bovina, sometidos o no a vacunación antibrucelósica con cepa 19. Muestras de bovinos fueron colectadas en el segundo semestre de 1998 y fueron sometidas a pruebas de aislamiento bacteriológico y de Rosa de Bengala (RB), Fijación de Complemento (FC) y Fluorescencia Polarizada (FP). La población expuesta estuvo constituida por un subgrupo de 116 muestras de bovinos infectados de *B. abortus* confirmados por aislamiento bacteriológico en leche y un subgrupo de 123 muestras de bovinos, declarados infectados con base a su historial serológico, y verificado al momento de toma de muestra. La población no expuesta estuvo constituida por una sub-población de 335 bovinos negativos a brucelosis bovina por serología y aislamiento, con certificación oficial de Libre de Brucelosis, sometidos a vacunación con cepa 19 y localizados en un área endémica, y una sub-población de 315 bovinos negativos por serología y aislamiento, con certificación oficial de Libre de Brucelosis, provenientes de una zona de brotes esporádicos y no sometidos a vacunación antibrucelósica. Las muestras de bovinos fueron aleatoriamente asignados a cuatro grupos de referencia conformados por una población expuesta verificada por aislamiento o serología y una población negativa proveniente de rebaños libres con y sin vacunación antibrucelósica. Un quinto grupo estuvo constituido por el agregado de las sub-poblaciones antes señaladas.

Se determinaron estadísticos en las poblaciones de referencia, curvas ROC, el punto de corte donde los parámetros de sensibilidad y especificidad diagnóstica se igualan según análisis TG-ROC (Two-Graphic, Receiver Operator Characteristic) y el punto de corte óptimo donde se minimizan el Costo de Clasificación Errónea. (Misclassification Costs Term, MCT). El análisis fue efectuado con el programa modular Computational Methods for Diagnostic Analysis (CMDT[®] versión 1.0 b.)

RESULTADOS Y DISCUSION: La formación de los grupos de referencia en este estudio buscó satisfacer las condiciones epidemiológicas que prevalecen en el sur de Chile. Los estadísticos calculados con los resultados de FP en las poblaciones de referencia expuestas y no expuestas, evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en las sub-poblaciones negativas vacunadas y no vacunadas.(Prueba de Mann Whitney, Z:9,096) Los estadísticos de FP observados en las poblaciones negativas sugieren un efecto de la condición vacunal de la población analizadas El efecto de la vacunación con Cepa 19 sobre los resultados de FP ha sido reportado por Samartino et al (1999). Las curvas ROC demostraron la alta habilidad discriminativa de FP y no se evidenciaron diferencias significativas en las áreas bajo la curva entre los grupos estudiados (rango 0.991- 1.0). Con el análisis TG-ROC se obtuvieron estimaciones de puntos de cortes que fluctuaron entre 102,5 y 120,8 mP, según el grupo de referencia y donde la Sensibilidad igualó a la Especificidad Diagnóstica, en un rango entre el 98,5 y 100%. En el grupo que considera la población combinada se observó una Sensibilidad y Especificidad de 99,6% con un punto de corte de 111 mP. El punto de corte óptimo donde se minimiza el MCT, fluctuó entre 102,5 a 121,0 mP según el grupo de referencia. El punto de corte óptimo estimado en el grupo D, conformado por bovinos seropositivos y bovinos de negativos provenientes de una población sin vacunación, mostró diferencias significativas con relación al obtenido en el grupo conformado por bovinos infectados y una población negativa y con historial de vacunación.

CONCLUSIONES: Con el análisis TG-ROC se obtuvieron diferentes puntos de corte en los grupos de referencia donde la Sensibilidad y Especificidad no fue inferior a 98,5%. Aún cuando las estimaciones de puntos de corte no evidenciaron

diferencias estadísticamente significativas, indicarían el efecto que tiene el origen y condición epidemiológica de las poblaciones de referencia. Las estimaciones de puntos de corte fueron superiores a las obtenidas en los estudios de validación de Argentina, México y Canadá. De manera similar, se obtuvieron diferentes estimaciones de puntos de corte en los grupos donde se minimiza la clasificación errónea, sin que la prueba pierda su óptimo rendimiento. Los puntos de corte en los grupos constituidos por poblaciones vacunadas fueron superiores a los observados en las poblaciones sin vacuna. Estos resultados sugieren que para mantener el alto rendimiento diagnóstico de la FP, se debería considerar la condición de vacunación con cepa 19 en la interpretación de resultados de la prueba.

REFERENCIAS:

DAJER, A., LUNA-MARTINEZ E., ZAPATA, D., VILLEGAS, S., GUTIERREZ, E., PENA, G., GURRIA, F., NIELSEN, K., GALL D. 1999. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México. Preventive Veterinary Medicine. 14;40 67-73.

JACOBSON, R.H. 1998. Factors in selecting serum samples for use in determining the Positive/Negative Threshold (Cut-Off) in Elisa. Abstract. Joint FAO/IAEA Meeting.

NIELSEN K. 2002. Diagnosis of Brucellosis by Serology. Veterinary Microbiology 90 447-459.

NIELSEN K, LIN, M. GALL, D. JOLLEY M. 2002. Fluorescence polarization assay. Detection of antibodies to Brucella abortus. Methods 22(1) 77-6

OIE. Manual of Standard for Diagnostic Test and Vaccines 2000a. Bovine Brucellosis. Paris pp. 328-345.

SAMARTINO L; GREGORET, R; GALL, D.; NIELSEN, K. 1999. Fluorescence polarization assay: Application of diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. Journal of Immunoassay 20(3): 115-126.

[Portada/](#) [Indice Posters/](#) [Contacto/](#) [Imprimir](#)

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO / DIVISION DE PROTECCION PECUARIA / BOLETIN VETERINARIO OFICIAL / SALUD E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS