

**TALLER REGIONAL DE ATENCIÓN INTEGRAL DE LA BRUCELO**

# **OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA BRUCELOSIS**

---

MC MAGDA CELINA NAVARRO SOTO



# Características del test

Amplia utilización en investigación y diagnóstico.

Permite la detección de proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos en una muestra líquida.

Utiliza anticuerpos.

Dependiendo el tipo de ELISA, se pueden detectar cantidades traza de la molécula de interés.

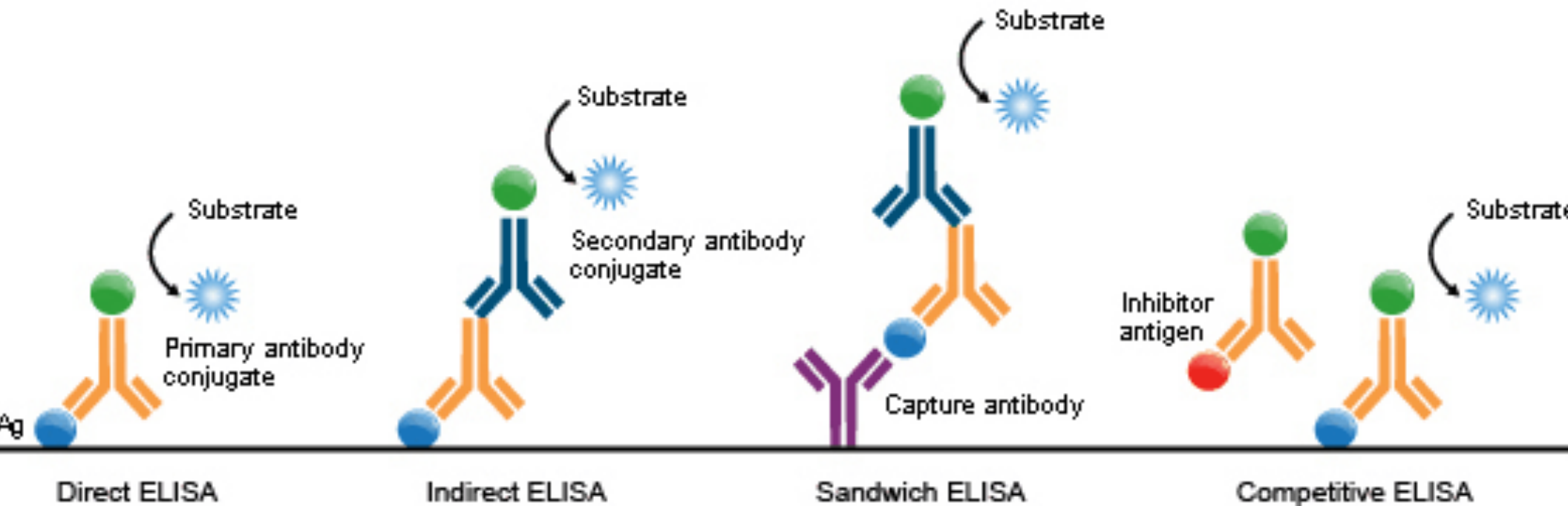
Sensibilidad y especificidad altas.

Seguimiento de la enfermedad.



- IgM (hasta 3 meses)
- IgG (desde la tercera semana)

# Tipos de ELISA



# Desventajas

---

Personal altamente capacitado.

Equipo para lectura.

La reacción colorimétrica no se detiene. Hay que hacer la lectura en el momento establecido.

Se debe validar y establecer punto de corte según el área.

Manejo adecuado de los reactivos.

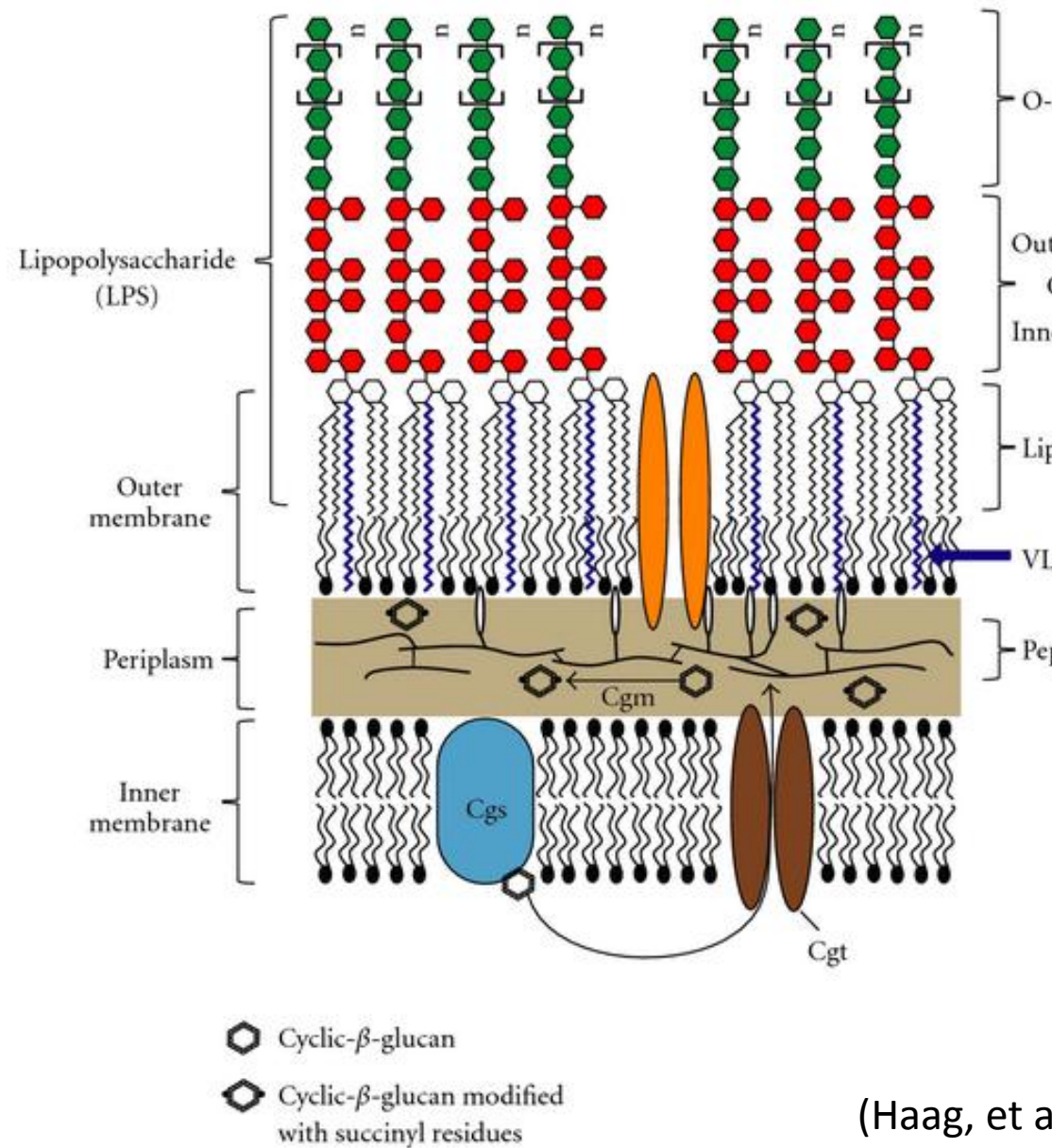
Tiempo de realización aproximado: 2 horas.

# ANTÍGENOS

Antígenos inmunodominantes: lipopolisácarido (LPS) (especies rugosas), LPS-R (especie lisa) y proteínas de membrana externa (OMP) (Salas *et al.*, 2001).

En *Brucella*, las principales OMPs son Omp25 y Omp31.

Las cepas rugosas de *Brucella* (*B. ovis*, *B. canis* y *B. abortus* RB51) carecen de la cadena O-antígeno y las OMPs están más expuestas en su superficie. (Caro-Hernández *et al.*, 2007).



# Objetivo

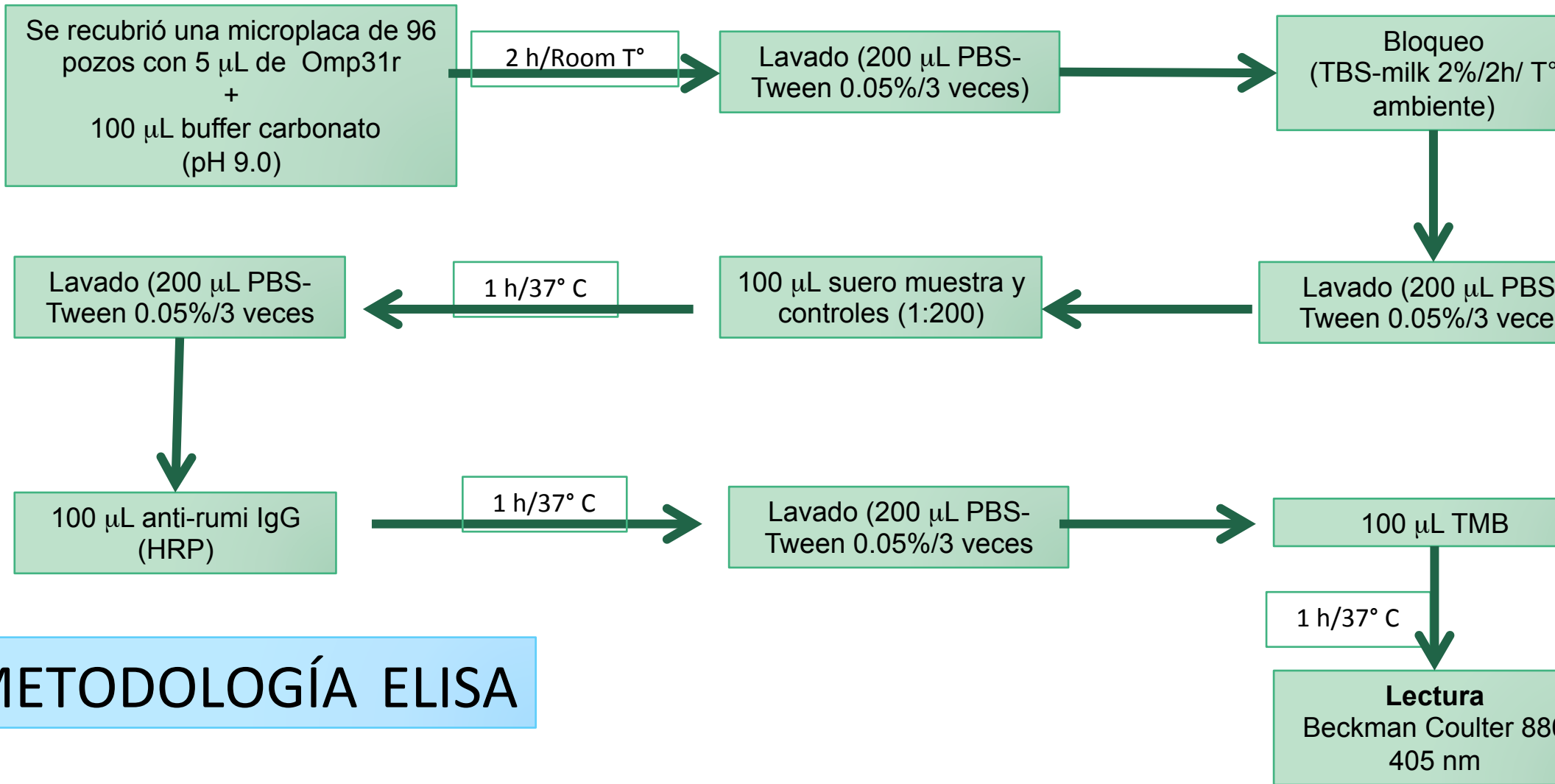
---

- Evaluar la proteína recombinante Omp31 de *Brucella ovis* como antígeno para detectar anticuerpos antibrucella mediante ELISAi

# Hipótesis

---

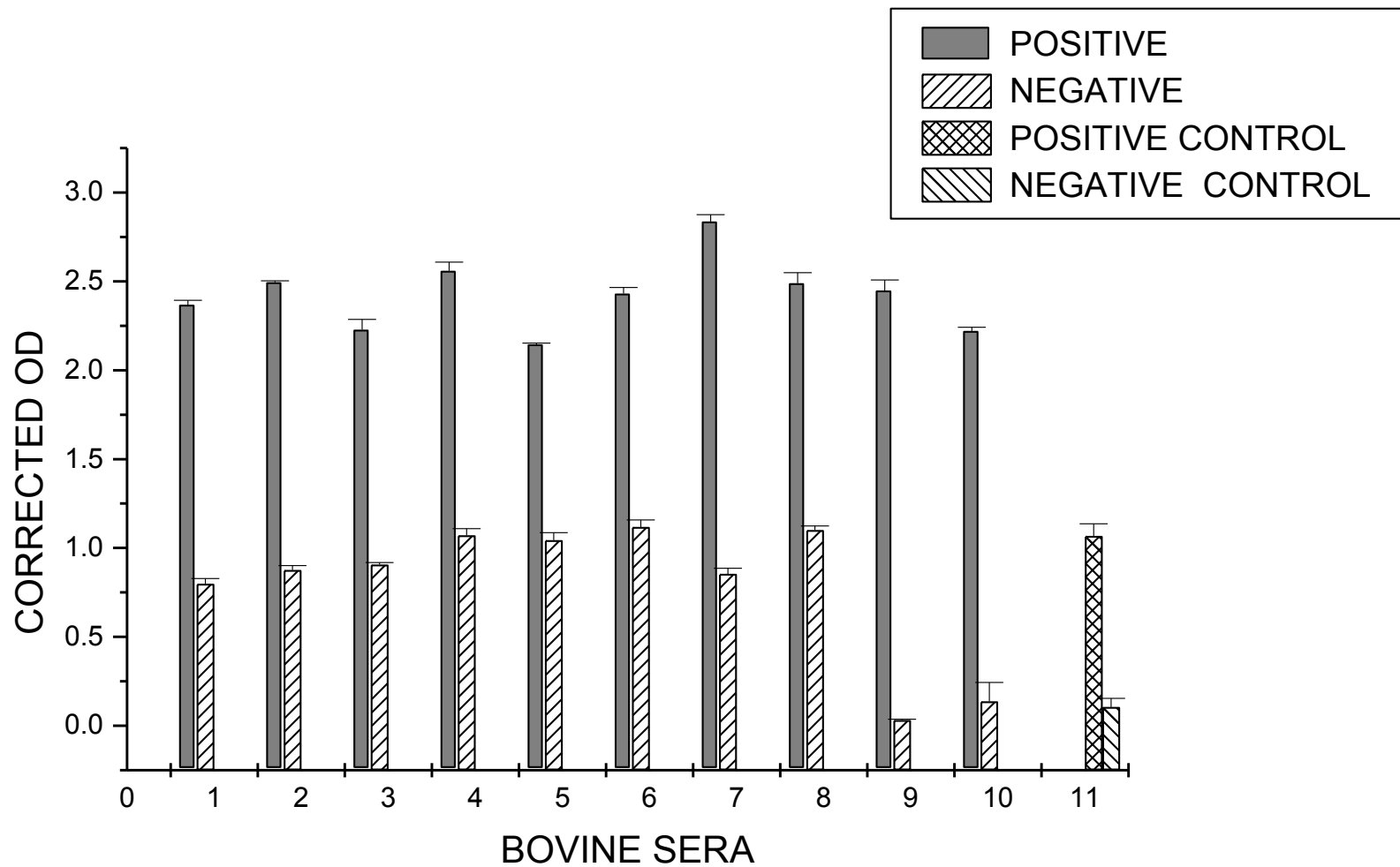
- La proteína recombinante Omp31 es efectiva para detectar anticuerpos antibrucela mediante ELISA en suero bovino.



# METODOLOGÍA ELISA

este trabajo, el gen *omp31* fue clonado y expresado en Sistema *E. coli*, usando las cepas DH5α y T





**Figure 1.** Graph showing corrected OD from bovine sera positive and negative to brucellosis. Column 1-10, (gr samples of bovine positive sera; column 1-10 (pattern) samples of bovine negative sera; column 11 (rhon positive control; column 11 (left diagonal), negative control. ( $t=-8.822$ ;  $p\text{-value}=2.49$ ,  $\alpha=0.05$ ).

## Sensibilidad y especificidad de algunos test serológicos para diagnóstico de brucelosis animal con antígenos convencionales y recombinantes

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Especie
RBT <sup>a</sup>	21-98.3	68.8-100	Bovino
iELISA <sup>a</sup>	92.5-100	90.6-100	Bovino
CFT <sup>a</sup>	23-97.1	30.6-100	Bovino
FPA <sup>a</sup>	95-99.3	96.9-100	Bovino
FPA <sup>b</sup>	85.7	99	Cabra
rOmp31-iELISA <sup>c</sup>	85	100	Cabra
<i>B. melitensis</i> rOmp28-iELISA <sup>d</sup>	88.7	93.8	Bovino, pequeños rumiantes, perros
<i>B. abortus</i> rOmp28-iELISA <sup>e</sup>	96.7	95.4	Bovino
rVirB5-ELISA <sup>f</sup>	88.2	97.8	Bovino

Referencias en anexo: a. [1]; b; [2]c. [3]; d. [4]; e. [5]; f. [6].

# Conclusiones y comentarios

En ingeniería genética, el aislamiento de un gen específico que codifica para cierta proteína y su introducción en el ADN de otro (ADN recombinante) resulta en la producción de un microorganismo genéticamente modificado capaz de producir la proteína de interés (proteína recombinante). De los múltiples sistemas disponibles para ello, el de *E.coli* es el más utilizado por su facilidad. (Baneyx, 1999).

En el género *Brucella*, se conoce que las proteínas de membrana, en especial las pertenecientes al grupo 3 (Omp25/Omp31), son las suficientemente inmunogénicas para conferir protección contra la enfermedad y se han propuesto como una opción para el desarrollo de vacunas. (Vizcaino, et al 2001<sup>a</sup>).

En *B. abortus* se describió una proteína de membrana llamada Omp31b (~31 kDa) la cual tiene similitud con la Omp31 de otras cepas de *Brucella*. Debido a esto, nuestra secuencia fue comparada con la reportada en BLAST por Kim, et al (2011) y se obtuvo una homología del 77%, un porcentaje alto que puede explicar la observada reacción en sueros bovinos.

# Conclusiones y comentarios

Las pruebas serológicas convencionales tienen discrepancias debido a una amplia gama de factores incluyendo la condición de la muestra, estatus de vacunado, diseminación amplia de la enfermedad, etc.

Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de moléculas inmuno-reactivas que prevengan los resultados erróneos que puedan comprometer las campañas de control y erradicación.

La utilización de proteínas recombinantes para el diagnóstico serológico de brucela aún deja resultados desestimables.

La modificación de la estructura terciaria de la proteína al momento de la manipulación, las condiciones de cultivo que modifican la expresión de las proteínas inmunodominantes podrían ser algunas razones que impidan el desempeño adecuado de tales pruebas con antígenos recombinantes.

**MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN**

A solid green horizontal bar spans the width of the slide at the bottom.

## REFERENCIAS TABLA

1. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*. 2002; 447–59. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00229-8
2. Ramírez-Pfeiffer, Díaz-Aparicio-E, Gómez-Flores R, Rodríguez-Padilla C, Morales-Loredo A, Alvarez-Ojeda G. Use of the *Brucella melitensis* Native Hapten To Diagnose Brucellosis in Goats by a Rapid, Simple, and Specific Fluorescence Polarization Assay. *Clinical And Vaccine Immunology*. 2008; (15:6) 911–915. DOI: 10.1128/CVI.00046-08
3. Gupta VK, Verma DK, Singh SV, Vihan VS. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Rumin Res*. 2007;70(2-3):260–6. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.01.012
4. Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V, Gangaplara A. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. *Mol Cell Probes*. 2010; 24(3):142–5. DOI: 10.1016/j.mcp.2009.12.002
5. Lim JJ, Kim DH, Lee JJ, Kim DG, Min W, Lee HJ, et al. Evaluation of Recombinant 28 kDa Outer Membrane Protein of *Brucella abortus* for the Clinical Diagnosis of Bovine Brucellosis in Korea. *J Vet Med Sci*. 2012;74(6):687–91. DOI: 10.1292/jvms.11-0512
6. Tan W, Wang X, Nie Y, Wang C, Cheng L, Wang X, et al. Recombinant VirB5 protein as a potential serological marker for the diagnosis of bovine brucellosis. *Mol Cell Probes*. 2012;26(3):127–31. DOI: 10.1016/j.mcp.2012.02.003