

VALIDACIÓN DE ELISA INDIRECTO PARA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS BOVINOS Y DE COBAYO CONTRA VIRUS PARAINFLUENZA 3 BOVINO (BPI3). EVALUACIÓN DE SEROPREVALENCIA A VIRUS BPI3 EN RODEOS BOVINOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Investigador USAL:

Directora Romera, Sonia (sonia.romerausal.edu.ar)

Investigadores Externos:

Parreño, Viviana; Maidana, Silvina

Alumnos practicantes USAL:

Echague, Roberto Hernán; Ferreccio, Carola; García del Bo, Sebastián

Resumen

En Argentina, la explotación ganadera ocupa un lugar preponderante de la economía. Un gran porcentaje de las pérdidas se encuentra vinculado a las enfermedades infecciosas. Entre las enfermedades más relevantes se encuentran las del complejo respiratorio bovino (CRB), la parainfluenza 3 (PI3) es uno de los patógenos implicados.

El virus de PI3 es endémico del ganado bovino, presenta distribución mundial. La seroprevalencia en nuestro país es 60-90 %.

El objetivo fue validar dos ELISA indirectos que cuantifiquen anticuerpos bovinos y de cobayos contra PI3 para complementar otros. La validación del ELISA bovino permitirá determinar seroprevalencia de PI3 en rodeos bovinos de Buenos Aires y aportará al desarrollo del modelo cobayo que evalúa calidad inmunogénica de vacunas comerciales.

Se continuó el desarrollo del ELISA PI3 experimental de bovinos planteado en este trabajo. Para establecer el punto de corte se realizó una curva de frecuencia con sueros positivos y negativos de historia conocida. El punto de corte se determinó en una densidad óptica corregida mayor o igual a 0.3, a partir de la cual los sueros se consideran positivos.

Para calcular la repetibilidad se evaluaron los resultados de una misma muestra dentro de una misma placa y, efectuando series en 6 placas a la vez, (variación entre placas). Para el parámetro repetibilidad se obtuvo un coeficiente de variación (desviación estándar de las réplicas dividida por la media de las réplicas) de 22.8 % entre réplicas y un coeficiente de variación de 12 % entre placas.

La linealidad es la capacidad del ensayo, dentro de un determinado intervalo, de dar un resultado que sea proporcional a la cantidad del analito a determinar. Se evaluó mediante la realización de 16 repeticiones de un suero positivo en 6 diluciones base 4. La linealidad obtenida fue de un 76 % (Regresión lineal, R^2).

La sensibilidad representa los sueros detectados positivos por la técnica del total de sueros fehacientemente positivos. La especificidad representa los sueros detectados negativos por la técnica

del total de sueros fehacientemente negativos. Ambos parámetros fueron calculados evaluando una serie de muestras de referencia, tomadas de animales de situación sanitaria conocida. Se evaluaron los sueros por inhibición de la hemoaglutinación para establecer la concordancia entre ambas técnicas, mediante el índice Kappa Ponderado.

Se logró calcular el punto de corte del ELISA y se determinó que la sensibilidad es del 92 % con una especificidad del 100 %.

Palabras clave: ELISA; PI3; modelo cobayo

Abstract

In Argentine, livestock farming occupies a preponderant place in the national economy. A sizeable percentage of the losses in livestock is due to the incidence of infectious diseases, whether of viral, bacterial or parasitic origin. Among the diseases that cause great economic losses in the livestock industry are those of the bovine respiratory complex (CRB). Parainfluenza 3 (PI3) is one of the pathogens implicated.

The PI-3 virus is endemic in cattle and has a worldwide distribution. Seroprevalence in our country is 60-90 %.

The objective was the validation of two indirect ELISAs that quantify bovine and guinea pig antibodies against PI3 to complement other assays. The validation of the bovine ELISA will allow the determination of seroprevalence of PI3 in bovine herds of Buenos Aires and will contribute to the development of the guinea pig model that evaluates the immunogenic quality of commercial vaccines.

We continued with the development of the experimental PI3 ELISA of bovine animals. To establish the cutoff point for this assay, a frequency curve was performed with positive and negative sera of known history. The cut-off point was determined at a corrected optical density greater than or equal to 0.3, from which the positive sera are considered.

To calculate repeatability, the results of a sample within the same plate were evaluated, making series with the same samples in 6 plates at the same time (variation between plates). For the repetitive parameter, a coefficient of variation (CV, standard deviation of the replicates/means of the replicates) was obtained: 22.8 % between replicates, and a CV of 12 % between the plates.

Linearity was evaluated by performing 16 replicates of a positive serum on 6 bases of dilutions 4. The Linearity obtained was 76 % (Linear Regression Analysis, R²)

Diagnostic sensitivity and specificity were calculated by testing a series of reference samples, taken from animals with known history and health status regarding specific disease/infection. The sera were evaluated by inhibition of hemagglutination to establish the concordance between both techniques. The degree of agreement was established by means of the Weighted Kappa index. The sensitivity represents the sera detected positive through the technique of the total of positively positive sera, and specificity represents the sera detected negative through the technique of the total of negative sera.

In conclusion, the cut-off point of PI3 bovine ELISA assay was calculated. The sensitivity was of 92 % and the specificity was of 100 %.

Keywords: ELISA; PI3; guinea pig model