

## ANÁLISIS DE ROBUSTEZ DE LA TÉCNICA DE POLARIZACIÓN FLUORESCENTE

P. A. Zimmer<sup>1</sup> y M. G. Biotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Mercedes, C°. Juan Pujol al este, s/n. 3470-Mercedes. Argentina. E-mail: zimmer.patricia@inta.gob.ar

## ÁREA TEMÁTICA. REQUISITOS TÉCNICOS

**RESUMEN.** La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método. El análisis de robustez nos permite conocer ante que parámetros, nuestro método es más sensible a sufrir modificaciones en el resultado final, proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal de la técnica de Polarización Fluorescente.

**PALABRAS CLAVE.** Robustez, Brucelosis, Polarización Fluorescente.

## 1.- Introducción

El laboratorio de brucelosis de la INTA Mercedes, realiza como prueba confirmatoria de brucelosis bovina, la técnica de polarización fluorescente (FPA), dicho laboratorio se encuentra dentro de la red de SENASA y acreditado bajo la Norma ISO/IEC 17025.

El FPA es un ensayo cualitativo, que utiliza la tecnología de polarización de fluorescencia y permite determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella abortus* en el suero de bovinos. Este ensayo validado para bovinos tiene la capacidad de diferenciar animales infectados de vacunas con Cepa 19, además de las reacciones cruzadas con otras bacterias gram negativas en un 90% de los casos. El ensayo diagnóstico emplea un extracto del O-polisacárido (OPS) extraído de la pared celular de *Brucella abortus* que se conjuga con un marcador fluorescente. El instrumento polarizador de fluorescencia (FP) permite medir el estado de polarización de la luz emitida por el conjugado OPS. Cuando no hay anticuerpos presentes, la polarización es baja, cuando los anticuerpos se ligan al conjugado, la polarización aumenta.

El FPA se encuentra validado por la organización mundial de sanidad animal (OIE) y el SENASA ha determinado el valor de corte para la Argentina en 94 % mili polarizaciones (mP). Para la ejecución de la técnica se debe cumplir con una serie de parámetros, con el objetivo que los resultados sean confiables y repetibles como ser: operarios capacitados, volúmenes dispensados, tiempos de incubación, agitación, limpieza de tubos, control de equipos intervinientes, etc.

La robustez de una técnica, es una medida de la capacidad

de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo del análisis de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de este, resultados confiables. Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas. El objetivo de este trabajo es determinar el grado de robustez del FPA considerando variables específicas de método.

## 2.- Materiales y Métodos

Para la determinación de robustez se realizó un diseño Plackett-Burman, se seleccionaron los parámetros que se encuentran bajo control rutinario. De estos parámetros se utilizaron las indicaciones descriptas por la técnica de referencia y las modificaciones que el laboratorio consideró, a continuación se describe en la Tabla 1 los parámetros utilizados en el estudio.

**Tabla 1.** Parámetros utilizadas en el estudio, con los valores descriptos por la técnica (Normal) y las variaciones realizadas (Variaciones)

	Parámetros	Variaciones	
		A -	Normal A +
<b>A</b>	Temperatura	<b>28 C°</b> B-	<b>26 C°</b> B+
<b>B</b>	Operario	<b>1</b> C-	<b>2</b> C+
<b>C</b>	Dilución Antígeno	<b>8 µl</b> D-	<b>10 µl</b> D+
<b>D</b>	Dilución Suero	<b>8 µl</b> E-	<b>10 µl</b> E+
<b>E</b>	Limpieza tubo	<b>No</b> F-	<b>Si</b> F+
<b>F</b>	Agitación	<b>No</b> G-	<b>Si</b> G+
<b>G</b>	Tiempo	<b>1</b>	<b>Como mínimos 2</b>

Se realizaron ocho ensayos con dos repeticiones por ensayo, en cada uno de ellos se efectuaron las diferentes combinaciones y variaciones especificadas en la Tabla 1.

A continuación se describen las combinaciones realizadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diferentes combinaciones realizadas en cada uno de los ensayos

Nº ensayo	Factor						
	A	B	C	D	E	F	G
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	+	+	+
3	-	+	-	+	-	+	+
4	-	+	+	+	+	-	-
5	+	-	-	+	+	-	+
6	+	-	+	+	-	+	-
7	+	+	-	-	+	+	-
8	+	+	+	-	-	-	+

Para la ejecución de la técnica se utilizó el kit comercial que se utiliza rutinariamente (Bio Tandil®) y la muestra utilizada para realizar todas las mediciones fue el suero positivo (control secundario del laboratorio). La ejecución se llevo a cabo cumpliendo los requisitos descriptos en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 2.4.3. (Versión adaptada en mayo de 2009 formato web) de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) y se realizaron las modificaciones específicas del diseño (Tabla 1).

### 3.- Resultados

Después de la ejecución de la técnica con las diferentes combinaciones (Tabla 2), se obtuvieron los siguientes resultados.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos en los ocho ensayos realizados y sus réplicas.

	Réplica 1	Réplica 2
Nº ensayo	Resultado ensayo	Resultado ensayo
1	210.6	211.6
2	210.4	207.1
3	218.5	227.0
4	240.6	242.5
5	232.1	221.9
6	193.6	202.8
7	191.9	220.1
8	227.1	224.0
Promedio	215.6	217.1

El análisis estadístico arrojó el efecto que tiene cada uno de los ocho factor es analizados sobre el resultado. Los factores A, B, C, E, F no afectan en forma significativa,

mientras que los factores D y G afectan significativamente los resultados ( $p \leq 0,05$ ). En la Tabla A1 (Apéndice A) se pueden observar cada uno de los efectos de los factores y sus réplicas.

### 4.- Conclusiones

Si bien la técnica de FPA se realiza siguiendo los procedimientos descriptos por la OIE, la realización del análisis de robustez permitió identificar que los factores dilución del suero (D) y tiempo de incubación (G), son los más sensibles a modificar los resultados.

Estos resultados confirman la necesidad de contar con los instrumentos que dispensan volumen, calibrados y bajo control continuo, así como también que el tiempo mínimo de incubación es de dos minutos.

El análisis de robustez en la técnica de FPA es una herramienta útil en el aseguramiento de la calidad de los resultados y es un indicador de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal.

**Agradecimientos.** Al Ing. Raul Kremer por su asesoramiento y recomendaciones sobre diseño Plackett-Burman.

### Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud Animal. (Versión adaptada en mayo de 2009 formato web). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Capítulo 2.4.3.
- SENASA. 2009. Manual de diagnóstico serológico de Brucelosis bovina. Laboratorio de referencia de la OIE para Brucelosis.
- Samartino, L. et al. 1999. *Fluorescence Polarization assay: Application to the Diagnosis of Bovine Brucellosis in Argentina*. Journal of immunoassay. 20(3): 115-126.
- Nielsen, K, et al. 1998. *Diagnosis of Bovine Brucellosis using a homogeneous Fluorescence Polarization Assay*. Vet immunol immunop. 66: 321-329.
- Nielsen, K, et al. 2001. *Fluorescence Polarization Assay for the Diagnosis of Bovine Brucellosis: adaptation to field use*. Vet microbial.
- Instituto de Salud Pública. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Guía Técnica N° 1. 45-48.

## Apéndice A

Tabla A1. Estimación del efecto de cada factor.

Estimación del efecto de cada factor:				Test t: Replica 1	Test t: Replica 2	Efecto del Factor
	Replica 1	Replica 2	Diferencias			
efecto: A	-8,85	-4,85	-4	-0,002371056	-0,002638971	Factor afecta en forma NO significativa
efecto: B	7,85	17,55	-9,7	0,00210314	0,003362344	Factor afecta en forma NO significativa
efecto: C	4,65	-1,05	5,7	0,001245809	0,001058268	Factor afecta en forma NO significativa
efecto: D	11,2	7,85	3,35	0,003000658	0,003442719	Factor afecta en forma significativa
efecto: E	6,3	6,55	-0,25	0,00168787	0,00041527	Factor afecta en forma NO significativa
efecto: F	-24	-10,75	-13,25	-0,006429981	-0,004219675	Factor afecta en forma NO significativa
efecto: G	12,85	0,75	12,1	0,003442719	0,001540516	Factor afecta en forma significativa
		<b>S=</b>	<b>8856,34021</b>			