

# Evaluación de una prueba inmunoenzimática sobre papel de nitrocelulosa para el serodiagnóstico de brucelosis en humanos y bovinos

Alonso Echegollen-Guzmán,\* Marcelo Torres-Puebla,\*\* Rosa I. Acosta-González,\*\*\* Anabel Bocanegra-Alonso,\*\*\* Efrén Díaz-Aparicio,\*\*\*\* Gerardo H. Flores-Gutiérrez\*\*\*\*

## RESUMEN

Se desarrolló una prueba inmunoenzimática sobre papel de nitrocelulosa para el diagnóstico de brucelosis humana y bovina utilizando lipopolisacárido de *Brucella melitensis* 16M como antígeno. Mediante una ELISA indirecta como prueba de constatación, se calcularon la sensibilidad y especificidad clínicas y valores predictivos positivo y negativo; la concordancia entre ambas técnicas se evaluó mediante la prueba de kappa con un 95% de confiabilidad. Los valores obtenidos por la prueba desarrollada para las muestras de suero humano fueron de 64.86%, 71.23%, 53.33% y 80%, para sensibilidad y especificidad clínicas y valores predictivos positivo y negativo, respectivamente, con una baja concordancia pero estadísticamente significativas entre ambas técnicas ( $\kappa = 0.343$ ;  $p < 0.05$ ). En los sueros bovinos se obtuvieron valores de 29.17%, 87.78%, 38.89% y 82.23%, respectivamente, presentando una concordancia inadecuada ( $\kappa = 0.187$ ;  $p < 0.05$ ). Se requirieron estudios posteriores para mejorar las características inmunológicas y epidemiológicas de esta prueba inmunoenzimática antes de ser considerada como una alternativa al diagnóstico de la brucelosis.

**Palabras clave:** Brucelosis, humano, bovino, prueba inmunoenzimática, avidina-biotina, papel de nitrocelulosa.

## ABSTRACT

An immunoenzymatic assay was developed on nitrocellulose paper for diagnosing human and bovine brucellosis, using lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* 16M as antigen. An indirect-ELISA was the gold-standard for calculating the epidemiological sensitivity and specificity and positive and negative predictive values; the results between both tests were analyzed with the kappa test with a confidence level of 95%. The results for the human serum samples were 64.86%, 71.23%, 53.33% and 80%, for clinical sensitivity and specificity and positive and negative predictive values, respectively; there were low agreement between both tests ( $\kappa = 0.343$ ;  $p < 0.05$ ). The results for bovine serum samples were 29.17%, 87.78%, 38.89% and 82.23%, respectively; showing inadequate agreement between the tests ( $\kappa = 0.187$ ;  $p < 0.05$ ). Additional surveys are required for improving the immunological and epidemiological features of this immunoenzymatic assay, before it can be considered as an alternative to the diagnosis of brucellosis.

**Key words:** Brucellosis, human, bovine, immunoenzymatic assay, avidin-biotin, nitrocellulose paper.

\* Facultad de Medicina "Dr. Alberto Romo Caballero". Universidad Autónoma de Tamaulipas. Tampico, Tamaulipas, México.

\*\* Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Victoria, Tamaulipas, México.

\*\*\* Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Reynosa, Tamaulipas, México.

\*\*\*\* CENID Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, D.F.

### Correspondencia:

Gerardo H. Flores-Gutiérrez

Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Calle 16 y Lago de Chapala s/n. 88740, Colonia Aztlán. Reynosa, Tamaulipas, México. Fax: + (52) 899 923 0622; E-mail: ghflores@uat.edu.mx

Recibido: 06-10-2009

Aceptado: 16-11-2009

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis (Br) es un problema de salud pública para las poblaciones que se encuentran en contacto directo con animales infectados y/o consumen sus productos. Además, debido a las pérdidas económicas ocasionadas por la Br en animales se han implementado estrategias para su control y erradicación, las cuales han contribuido con una disminución en la incidencia de casos humanos.<sup>1</sup> Sin embargo, el éxito de cualquier estrategia, ya sea para el tratamiento en humanos o para el control y erradicación en animales domésticos, depende de la adecuada identificación de los casos mediante técnicas de diagnóstico confiables.<sup>2</sup>

El cultivo microbiológico es el diagnóstico definitivo,<sup>2</sup> a pesar de requerir de un tiempo prolongado para obtener resultados y del riesgo de infección para el personal que lo realiza.<sup>3</sup> También se cuenta con técnicas moleculares altamente sensibles y específicas basadas en la identificación del ADN bacteriano; sin embargo, representan un alto costo para diagnosticar grandes cantidades de muestras, además de que sus resultados pueden variar entre laboratorios.<sup>4</sup>

Las pruebas inmunológicas, el principal medio diagnóstico de la Br,<sup>2,5</sup> se basan en la identificación de anticuerpos dirigidos en contra del lipopolisacárido (LPS) de la membrana de las cepas lisas de *Brucella* spp.<sup>1</sup> Sin embargo, llegan a presentar reacciones cruzadas con el LPS de otras bacterias Gram negativas, como *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella* group N (0:30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia hermannii*, *E. coli* 0157 y *Francisella tularensis*.<sup>6</sup>

La técnica de ELISA, la cual se basa en reacciones inmunoenzimáticas, posee altos valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Spe) clínicas, de 100% y 98%, respectivamente.<sup>5</sup> Como alternativa a la ELISA se han desarrollado variantes de las técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas,<sup>7-11</sup> incluyendo Br.<sup>1,12</sup> Debido a que las reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ab) de estas técnicas se llevan a cabo sobre papel de nitrocelulosa (PNC) y otras membranas, su uso se realiza de manera más rápida y con un menor costo.<sup>1</sup>

Además de lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>2</sup> ha sugerido la realización de estudios enfocados a mejorar las características de las técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de la Br. Por lo tanto, el presente reporte describe la evaluación de una técnica inmunoenzimática (PIE) basada en el sistema avidina-biotina sobre PNC como una alternativa para el diagnóstico de esta enfermedad,

basada en las características de ELISA, pero que pueda realizarse sin la necesidad de equipo de laboratorio sofisticado y en laboratorios con una infraestructura mínima.

## MÉTODOS

### Muestras biológicas

La implementación de la PIE se realizó utilizando como controles positivos dos muestras de suero de origen caprino; dichos animales fueron infectados artificialmente con *B. mellitensis* y su estado de infección fue determinado mediante cultivo microbiológico de muestras de leche y ELISA indirecta (i-ELISA). De la misma manera, se utilizaron dos muestras de origen caprino de animales sanos respecto a la infección con *B. mellitensis*, determinado mediante las mismas técnicas de diagnóstico mencionadas anteriormente.

Para el desarrollo de la PIE, se utilizaron 110 muestras de suero de origen humano y 114 muestras de bovino, con un estado desconocido respecto a la infección y/o presencia de anticuerpos en contra de *Brucella* spp. Estas muestras fueron utilizadas para la evaluación de la validez diagnóstica de la PIE.

### Antígeno

El antígeno utilizado fue LPS de la membrana externa de *B. mellitensis* 16M del cual, una vez obtenido mediante la metodología previamente reportada.<sup>1</sup> Brevemente, las células de *B. mellitensis*, previamente lavadas con solución salina, fueron suspendidas en una solución de ácido acético al 2% y NaCl al 10% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EU) y sometidas al autoclave a 120 °C por 30 minutos; después de remover los detritos celulares por centrifugación (12,000 g por 30 minutos) el LPS fue precipitado con metanol y purificado mediante la digestión con lisozima, nucleasas y proteínasa K, seguido de la extracción con fenol, ultracentrifugación (100,000 g a 4 °C por 18 horas) y filtración en gel.

Una vez obtenido, se diluyeron 2 mg de LPS en 1 mL de solución amortiguadora de Tris (TBS) (Trisma hidrocloreto + Trisma base) [Sigma Chemical Company] en agua destilada, pH 7.5.

### Desarrollo del sistema avidina-biotina

La PIE se desarrolló siguiendo los procedimientos previamente descritos:<sup>1</sup> como fase sólida se utilizaron tiras de 10 x 5 mm de PNC (Applied Scientific Com-

pany, Richmond, CA, EU), con una capacidad para concentrar 80 µg proteína/cm<sup>2</sup>, depositando en ellas 5 µL de antígeno diluido.

Las muestras de suero fueron diluidas 1:2,000 en solución bloqueadora (TBS + 0.5% v/v Tween 20 + 0.05% v/v gelatina de porcino + 0.5 mol NaCl [Sigma Chemical Company]); además de utilizarse como diluyente de las muestras de suero y conjugados, esta solución bloqueadora se utilizó para llenar los poros del PNC no ocupados por los anticuerpos y evitar de esta manera reacciones inespecíficas que alteraran los resultados de la PIE. El segundo proceso de incubación consistió en IgG biotinilada de conejo anti IgG bovina (H+L) e IgG biotinilada de cabra anti IgG humana (H+L) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EU), dependiendo del caso, diluidas 1:2,000 en solución bloqueadora. La última incubación consistió en conjugado de estreptoavidina-peroxidasa (Sigma Chemical Company) diluida 1:500. Entre cada proceso de incubación se utilizó una solución lavadora (TBS + 0.05% v/v de Tween 20 [Sigma Chemical Company]) para eliminar los anticuerpos y conjugados que no se unieron durante las reacciones.

La reacción Ag-Ab se reveló con un sustrato, preparado pocos minutos antes de su utilización, compuesto por la mezcla de la Solución A (10 mL de metanol frío + 30 mg de 4-cloronaftol [Sigma Chemical Company]) y la Solución B (50 mL de TBS + 30 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% [Sigma Chemical Company]); con este sustrato las muestras positivas desarrollaron un punto de coloración azul oscura, el cual fue considerado como el punto de corte de la PIE. La totalidad de las reacciones fueron realizadas a temperatura ambiente (*Cuadro I*).

### Evaluación del sistema avidina-biotina

La validez diagnóstica de la PIE se evaluó utilizando una i-ELISA casera como prueba de constatación, la cual fue previamente validada.<sup>5</sup>

Una vez obtenidos los resultados de ambas pruebas se calcularon la Se y Spe y los valores predictivos positivo (VP+) y negativo (VP-) con un 95% de confiabilidad (software Win Episcopo 2.0). La concordancia entre ambas técnicas se evaluó mediante la prueba de kappa, con el mismo nivel de confianza.

## RESULTADOS

### Desarrollo del sistema avidina-biotina

Los procesos de la PIE fueron considerablemente más rápidos (1 hora y 45 minutos) en comparación con la i-ELISA, ya que esta última requirió de una noche como periodo de incubación. Sin embargo, mediante la PIE se pudieron analizar visualmente 75 muestras de manera simultánea gracias a una cámara de incubación diseñada especialmente para el desarrollo de la PIE, en contraste de las 96 muestras analizadas en una placa de i-ELISA.

La PIE presentó el inconveniente de que una vez agregado el sustrato, la reacción de coloración continuó desarrollándose sin detenerse, por lo que los resultados de esta prueba tuvieron que ser interpretados de manera rápida, inmediatamente después de finalizar el tiempo de tres minutos requerido para la incubación del sustrato.

### Evaluación del sistema avidina-biotina

La Se y Spe, y los VP+ y VP- obtenidos por la PIE en las muestras de origen humano fueron de 64.86, 71.23, 53.33 y 80%, respectivamente (34 pares discordantes: 21 falsos positivos y 13 falsos negativos) (*Cuadro II*). Además, se presentó una concordancia baja estadísticamente significativa entre los resultados de ambas técnicas ( $\kappa = 0.343$ ;  $p < 0.05$ ; intervalo de confianza [IC95%] 0.158 a 0.527). En el caso del suero bovino, los resultados de la PIE fue-

**Cuadro I.** Procedimientos y tiempo requerido por una prueba inmunoenzimática basada en el sistema avidina-biotina sobre papel de nitrocelulosa para el diagnóstico de brucelosis en muestras de suero de humano y bovino.

Procedimiento	Cantidad o dilución	Tiempo requerido (min)
Depósito del antígeno	5 µL	---
Incubación de la muestra de suero	1:2,000	40
Lavado de la tira de papel	6 mL	1
Incubación de IgG biotinilada anti IgG humana o bovina	1:2,000	30
Lavado de la tira	6 mL	1
Incubación de estreptoavidina-peroxidasa	1:500	30
Uso del sustrato	6 mL	3
Tiempo total requerido		105

**Cuadro II.** Resultados de la i-ELISA y la técnica inmunoenzimática desarrollada sobre papel de nitrocelulosa (PIE) para el serodiagnóstico de brucelosis en muestras de suero de origen humano.

		i-ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
PIE	Positivo	24	21	45
	Negativo	13	52	65
	Total	37	73	110

**Cuadro III.** Resultados de la i-ELISA y la técnica inmunoenzimática desarrollada sobre papel de nitrocelulosa (PIE) para el serodiagnóstico de brucelosis en muestras de suero de origen bovino.

		i-ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
PIE	Positivo	7	11	18
	Negativo	17	79	96
	Total	24	90	114

ron de 29.17, 87.78, 38.89 y 82.23%, respectivamente (28 pares discordantes: 11 falsos positivos y 17 falsos negativos) (*Cuadro III*); de igual manera, se observó una mala concordancia ( $\kappa = 0.187$ ;  $p < 0.05$ ; IC95% 0.006 a 0.367).

## DISCUSIÓN

Las técnicas inmunológicas han sido ampliamente utilizadas en el diagnóstico de la Br debido a su validez diagnóstica y capacidad para procesar una gran cantidad de muestras.<sup>13</sup> En el diagnóstico rutinario de Br en humanos, generalmente se utiliza la prueba de Huddlenson, la cual presenta una baja Se, del orden del 54.93%.<sup>14</sup> Por otro lado, la prueba de rosa de Bengala se utiliza como tamiz en las campañas para el control y erradicación de la Br en bovinos en México. La i-ELISA ha sido evaluada satisfactoriamente para el diagnóstico de la Br tanto en humanos como bovinos, con altos valores de Se y Spe.<sup>13,15</sup>

Debido a su simplicidad y bajo costo, se han desarrollado variantes de ELISA utilizando membranas como fase sólida.<sup>2</sup> Empleando una técnica similar para el diagnóstico de Br caprina, Santellano-Estrada y cols.<sup>1</sup> reportaron una Se aceptable del 92%, pero una baja Spe del 69%. De manera contraria, Olsen y cols.<sup>16</sup> obtuvieron en sueros bovinos una Se del 53% y Spe del

100%; dicha prueba fue similar a la obtenida en este reporte. Estos bajos valores de validez diagnóstica probablemente fueron consecuencia de las reacciones cruzadas mencionadas con anterioridad. La falta de concordancia entre la PIE y las técnicas utilizadas como de constatación también ha sido reportado previamente.<sup>12</sup> Otras técnicas basadas en el sistema avidina-biotina han demostrado altos valores de Se y Spe, utilizando anticuerpos monoclonales como diferencia con la PIE presentada en este reporte.<sup>7,9,10</sup>

A pesar del menor tiempo requerido para el desarrollo de la PIE los resultados de esta última, en comparación con la i-ELISA, son de valor diagnóstico limitado. Además su especificidad inmunológica, es decir la presencia de reacciones cruzadas, no fue evaluada. Por lo anterior, se requieren estudios posteriores para mejorar las características inmunológicas y epidemiológicas de la PIE, antes de ser considerada como una alternativa al diagnóstico de la Br.

## AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado parcialmente por el Sistema Regional de Investigación "Alfonso Reyes" (México) (Proyecto No. 970402015) y el Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT - Gobierno del Estado de Tamaulipas (Proyecto No. TAMPS-2005-C08-22). El estudio forma parte de las tesis de Maestría de Alonso Echegollen-Guzmán y Marcelo Torres-Puebla; este último fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México).

## REFERENCIAS

- Santellano-Estrada E, Infante F, Díaz-Aparicio E, Flores-Gutiérrez GH. Use of an immunobinding test on nitrocellulose paper to diagnose caprine brucellosis. *Vet Res Commun.* 2004; 28: 27-31.
- WHO (World Health Organization). *Sixth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis.* WHO Technical Report Series 740, 1986. Geneva: World Health Organization.
- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Soares RM, Sakamoto SM, Vasconcellos SA, et al. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol.* 2002; 20: 139-47.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2003; 15: 374-8.
- Díaz-Aparicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, Aragon V, Perez-Ortiz S, Pardo M, et al. Evaluation of serological

- tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1159-65.
6. Moriyón UI. *Características estructurales y antigénicas de Brucella*. Diagnóstico de brucelosis animal. México, D.F.: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México; 1998: 10-22.
  7. Infante F, Infante F, Flores-Gutiérrez GH. Improved immunobinding test using monoclonal antibodies for detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Can J Vet Res.* 2002; 66: 282-4.
  8. Flores-Gutiérrez GH, Infante F. Desarrollo y evaluación de una prueba inmunoenzimática en papel de nitrocelulosa utilizando anticuerpos policlonales para el diagnóstico de micoplasmas en muestras de leche bovina. *Med Vet.* 2003; 20: 11-5.
  9. Flores-Gutiérrez GH, Infante F, Salinas-Meléndez JA, Thomas CB, Estrada-Bellmann PC, Briones-Encinia F. Development of an immunobinding assay with monoclonal antibodies to diagnose *Mycoplasma bovis* in semen. *Vet Res Commun.* 2004; 28: 681-6.
  10. Flores-Gutiérrez GH, Infante F, Salinas-Meléndez JA, Thomas CB, Estrada-Bellmann PC, Briones-Encinia F. Development of a rapid immunobinding test for *Mycoplasma bovis* cultural isolates in the genital tract of heifers. *Ital J Anim Sci.* 2009; 8: 285-90.
  11. Hernández-Cruz E, González-Cabriaes JJ, Ordaz-Pichardo C, de la Cruz-Hernandez NI, Flores-Gutiérrez GH. Development of an immunobinding dot-blot assay as an alternative for the serodiagnosis of human cysticercosis. *J Helminthol.* 2009; 25: 333-337
  12. Gurturk K, Boynukara B, Ilhan Z, Hakki Ekin I, Gulhan T. Comparison of the dot-immunobinding assay with the serum agglutination test, the rose bengal plate test and the milk ring test for the detection of *Brucella* antibodies in bovine sera and milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 1999; 46: 279-85.
  13. Uzal FA, Carrasco AE, Nielsen K, Echaide S, Cabrera RF. An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Microbiol.* 1996; 52: 175-80.
  14. Durán-Guerrero RI, Acosta-González RI, Bocanegra-Alonso A, Bocanegra-García V, Flores-Gutiérrez GH. *Evaluación de la técnica de Huddleson para el diagnóstico de brucelosis humana*. Memorias del XVII Encuentro de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México; 2005; p. 149-51. Altamira, Tamaulipas, México.
  15. Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis. A review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clin Lab.* 2003; 49: 577-89.
  16. Olsen SC, Stevens MG, Cheville NF, Schurig G. Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J Vet Diagn Invest.* 1997; 9: 363-7.