

Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán, México

Alfredo F. Dájer Abimerhi*
Edwin José Gutiérrez Ruiz*
Delfina de las M. Zapata Villalobos*

Abstract

Negative sera from vaccinated (322) and non-vaccinated (248) brucellosis free bovine herds, and positive sera (90) to Rose Bengal Plate Test (RB), and Complement Fixation Test (FC) from *Brucella abortus* infected herds were used to determine relative sensitivity and specificity of an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (I-ELISA) and a Rivanol Agglutination Test (RIV). Test agreement using *Kappa* analysis was determined using 698 sera. The I-ELISA had a sensitivity of 100%, and a specificity of 92.8%. The RIV had a sensitivity of 97.8%, and a specificity of 100%. Agreement (*Kappa*) for I-ELISA and FC was 0.73, for I-ELISA and RIV 0.74, for I-ELISA and RB 0.79, and for RIV and FC it was 0.96. Predictive values (PV) for I-ELISA of 66.9% for positive and 100% for negative ones, and for RIV of 100% for positives and 99.7% for negative ones were also determined. It is concluded that the I-ELISA could be used as a screening test under the Yucatan State conditions, or as a confirmatory test in places where vaccination is not being carried out. The RIV lacked sensitivity, and is therefore, not recommended for final stages of eradication programs, but could be used as a confirmatory test in control programs or in early stages in eradication campaigns.

Key words: BOVINE BRUCELOSIS, KAPPA ANALYSIS, ELISA, RIVANOL.

Resumen

Se usaron sueros negativos de animales vacunados (322) y no vacunados (248) provenientes de hatos libres de brucelosis y sueros positivos (90) a las pruebas de Rosa de Bengala (RB) y fijación de complemento (FC) de hatos infectados con *Brucella abortus*, para determinar la sensibilidad relativa y la especificidad de las pruebas inmunoenzimática indirecta (I-ELISA) y de aglutinación con rivanol (RIV). La concordancia entre pruebas se determinó mediante el análisis kappa usando 688 sueros. La prueba I-ELISA mostró una sensibilidad del 100% y especificidad de 92.8%. La RIV tuvo una sensibilidad de 97.8% y especificidad de 100%. La concordancia (kappa) entre I-ELISA y FC fue de 0.73, entre I-ELISA y RIV de 0.74, entre I-ELISA y RB de 0.79 y entre RIV y FC fue de 0.96. Los valores predictivos (VP); para I-ELISA fueron 66.9% para positivos y 100% para negativos y para RIV, 100% para positivos y 99.7% para los negativos. La prueba I-ELISA puede ser usada como tamiz en las condiciones de Yucatán o como prueba confirmatoria en lugares donde la vacunación no se lleva a cabo. La prueba de RIV mostró una falta de sensibilidad, por lo tanto no se recomienda en etapas finales de programas de erradicación, pero podría usarse como prueba confirmatoria en programas de control o etapas tempranas en campañas de erradicación.

Palabras clave: BRUCELOSIS BOVINA, ANÁLISIS KAPPA, ELISA, RIVANOL.

Recibido el 14 de mayo de 1997 y aceptado el 19 de noviembre de 1997.

* Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5, Carretera Mérida-Xmatkuil, Apartado Postal 4-116, Mérida, Yucatán, México.

Introducción

Yucatán, México, es una zona donde la brucelosis bovina es endémica y la vacunación con la cepa 19 en dosis completa, es una práctica común. La vacunación, sin embargo, no es uniforme y en la mayoría de los casos no existen registros, lo que hace difícil la interpretación del diagnóstico serológico.

En América Latina, México tiene una de las incidencias más altas de brucelosis. La pérdida estimada por esta enfermedad en el país se calcula en 350 millones de dólares.¹ Otro aspecto importante de la brucelosis es su fuerte potencial zoonótico. Durante 1988, en México se notificaron 6303 casos de brucelosis en humanos.²

A pesar de que se han realizado algunos estudios de seroprevalencia, se han empleado diferentes técnicas y los resultados varían de una zona a otra y entre laboratorios dentro del país. Yucatán no es la excepción y ninguno de los estudios realizados se ha hecho siguiendo un diseño de muestreo confiable, ni se ha usado un protocolo de diagnóstico adecuado para las condiciones de la zona.

En estudios previos, las pruebas de Rosa de Bengala (RB), aglutinación con rivanol (RIV), aglutinación con 2-mercaptoethanol (2-ME), y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto (I-ELISA) fueron comparadas con la de fijación del complemento (FC) con la finalidad de determinar su sensibilidad y especificidad relativas.³ Sin embargo, las muestras incluidas no fueron suficientes y los resultados, por lo tanto, son de un valor limitado.

A pesar de que el diagnóstico definitivo de las enfermedades infecciosas sólo puede lograrse a través del aislamiento, en algunas ocasiones esto puede ser difícil y fuera del límite de experiencia y capacidad de muchos laboratorios, particularmente en países en vías de desarrollo. Sin embargo, un diagnóstico presuntivo preciso puede lograrse cuando las técnicas serológicas son usadas en combinación con observaciones clínicas e historia epidemiológica.⁴

Las pruebas serológicas clásicas como aglutinación, precipitación, fijación del complemento y neutralización viral han demostrado su utilidad, pero tienen variadas desventajas, como el mal desempeño y falta de estandarización, entre otras. Las técnicas de ELISA tienen el potencial de resolver todos estos problemas.⁴

Las pruebas de ELISA se han usado ampliamente en la detección de antígenos y anticuerpos en el diagnóstico de las enfermedades de los animales. Desafortunadamente, poco se ha hecho con respecto a reactivos y protocolos de referencia aceptables internacionalmente. Esta situación ha tenido un impacto negativo en el control internacional de enfermedades y el comercio internacional de ganado.⁵

El objetivo del presente estudio fue evaluar las pruebas de I-ELISA (FAO/AIEA) y RIV para el diagnóstico de brucelosis bovina bajo condiciones del estado de Yucatán, México.

Material y métodos

Para determinar la sensibilidad relativa y la especificidad de la I-ELISA y RIV, se estableció un banco de sueros con 248 sueros de hatos libres de brucelosis en los cuales no se vacuna, 322 sueros de hatos libres donde se aplica la vacuna cepa 19 de *Brucella abortus*, dosis completa en becerras y 90 sueros de animales infectados [positivos a las pruebas de Rosa de Bengala (RB) y Fijación del complemento (FC)] de hatos con al menos 2% de seropositividad y manifestación de signos clínicos, estos últimos fueron considerados como la población de animales infectados. Se colectaron 698 sueros siguiendo los mismos criterios y se usaron para determinar la concordancia entre RB, RIV, I-ELISA y FC. Todos los sueros provinieron de animales mayores de 24 meses.

El método descrito por Alton *et al.*,⁶ se usó para la prueba de RB. Para RIV se usó el método descrito por Ciprian *et al.*,⁷ El antígeno en ambos casos fue elaborado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (Pronabive). Las diluciones de suero usadas fueron 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200. El método de microtitulación para FC se usó según la técnica del Laboratorio Central Veterinario (CVL), Weybridge, Inglaterra,⁸ con la excepción de que las muestras se corrieron en diluciones dobles de 1/2 hasta 1/256, debido a un fuerte efecto de prozona encontrado previamente en diluciones bajas. La concentración de anticuerpos en unidades internacionales (UI) se derivó de cuadros estándares. Los sueros testigo positivo y negativo, así como el antígeno fueron proporcionados por el CVL, Weybridge. Se utilizó el paquete de ELISA desarrollado bajo los auspicios de la Food and Agriculture Organization de las Naciones Unidas/Agencia Internacional de Energía Atómica (FAO/AIEA), siguiendo el protocolo proporcionado. El antígeno fue un extracto con agua/fenol calientes de *B. abortus* y el conjugado fue anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG1 bovina marcado con peroxidasa de rabano picante. El sustrato fue peróxido de oxígeno

Cuadro 1
NIVELES DE ANTICUERPOS PARA LA INTERPRETACIÓN
DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS

| | Vacunados | No vacunados |
|-----------|-----------------|-----------------|
| <i>RB</i> | <i>Reacción</i> | <i>Reacción</i> |
| Rivanol | 1:50 | 1:25 |
| FC | 50 UI | 20 UI |
| I-ELISA* | 37.0 % | 28.0% |

* Estos valores son el punto de corte calculado usando el paquete FAO/AIEA para cada grupo.

Cuadro 2

SENSIBILIDAD RELATIVA Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA I-ELISA USANDO SUEROS DE ANIMALES NO VACUNADOS Y VACUNADOS CON LA CEPA 19 DE *B. Abortus* (N = 652)

| | | Infectado | | Sens.(%)* | Esp.(%) |
|-------------|-----------|-----------|-----|-----------|---------|
| | | (+) | (-) | | |
| No vacunado | ELISA (+) | 83 | 4 | 100.0 | 98.4 |
| | ELISA (-) | 0 | 244 | | |
| Vacunado | ELISA (+) | | 37 | | 88.5 |
| | ELISA (-) | | 284 | | |
| Total | ELISA (+) | 83 | 41 | 100.0 | 92.8 |
| | ELISA (-) | 0 | 528 | | |

* Sensibilidad relativa.

Cuadro 3

SENSIBILIDAD RELATIVA Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DE RIVANOL USANDO SUEROS DE ANIMALES NO VACUNADOS Y VACUNADOS CON LA CEPA 19 DE *Brucella Abortus* (N = 660)

| | | Infectado | | Sens.(%)* | Esp.(%) |
|-------------|---------|-----------|-----|-----------|---------|
| | | (+) | (-) | | |
| No vacunado | RIV (+) | 88 | 0 | 97.8 | 100 |
| | RIV (-) | 2 | 248 | | |
| Vacunado | RIV (+) | | 0 | | 100 |
| | RIV (-) | | 322 | | |
| Total | RIV (+) | 88 | 0 | 97.8 | 100 |
| | RIV (-) | 2 | 570 | | |

* Sensibilidad relativa.

(H₂O₂) y el cromógeno fue ácido sulfónico 2,2'-azinodiethylbenzothiazoline (ABTS). La densidad óptica (DO) de cada pozo se midió con un lector automático* conectado a una computadora personal; para interpretar los resultados se usó el software BREIA 1.01. Todo el equipo fue proporcionado por la FAO/AIEA.

Los niveles de anticuerpos para la interpretación de las pruebas RB y RIV, se tomaron de los artículos que describen la técnica; para FC, se calcularon a partir de un cuadro proporcionado por el Centro de Medicina Veterinaria Tropical de la Universidad de Edimburgo (Cuadro 1).

El punto de corte para I-ELISA se determinó mediante el suero de animales vacunados provenientes de hatos libres, calculando la media del porcentaje de positividad (PP) y agregando tres desviaciones estándares.⁵

Cuadro 4

CONCORDANCIA ENTRE I-ELISA Y RB USANDO SUEROS DE ANIMALES NO VACUNADOS Y VACUNADOS CON LA CEPA 19 DE *Brucella abortus* (N = 690)

| | | RB(+) | RB(-) | Valor kappa |
|-------------|-------------|-------|-------|-------------|
| No vacunado | I-ELISA (+) | 96 | 6 | 0.95 |
| | I-ELISA (-) | 1 | 264 | |
| Vacunado | I-ELISA (+) | 1 | 35 | * |
| | I-ELISA (-) | 0 | 287 | |
| Total | I-ELISA (+) | 97 | 41 | 0.79 |
| | I-ELISA (-) | 1 | 551 | |

* Kappa no se calculó debido al insuficiente número de muestras positivas en este grupo.

La sensibilidad y especificidad de cada prueba se calculó usando el método descrito por Thrusfield.⁹

El valor predictivo de I-ELISA y RIV se determinó con la fórmula de Thrusfield,⁹ usando una prevalencia estimada del 4%.

La concordancia entre pruebas se calculó mediante la fórmula para el análisis Kappa.¹⁰

Para el manejo y análisis de los datos se usó el programa Epi-Info versión 5.01b.¹¹

Resultados

La sensibilidad relativa de la prueba I-ELISA obtenida mediante sueros de animales no vacunados, fue de 100%. La especificidad determinada con sueros de animales no vacunados, fue de 98.4% y con sueros de animales vacunados, de 88.5%; la especificidad total fue de 92.8% (Cuadro 2).

Cuadro 5

CONCORDANCIA ENTRE I-ELISA Y RIVANOL USANDO SUEROS DE ANIMALES NO VACUNADOS Y VACUNADOS CON LA CEPA 19 DE *Brucella abortus* (N = 690)

| | | RIV(+) | RIV(-) | Valor kappa |
|-------------|-------------|--------|--------|-------------|
| No vacunado | I-ELISA (+) | 89 | 13 | 0.90 |
| | I-ELISA (-) | 1 | 264 | |
| Vacunado | I-ELISA (+) | 0 | 36 | * |
| | I-ELISA (-) | 0 | 287 | |
| Total | I-ELISA (+) | 89 | 49 | 0.74 |
| | I-ELISA (-) | 1 | 551 | |

* Kappa no se calculó debido al insuficiente número de muestras positivas en este grupo.

*Immunoskan Plus-BDSL.

Cuadro 6

CONCORDANCIA ENTRE I-ELISA Y FIJACIÓN DE COMPLEMENTO, USANDO SUEROS DE ANIMALES NO VACUNADOS Y VACUNADOS CON LA CEPA 19 DE *Brucella abortus* (N = 680)

| | | FC(+) | FC(-) | Valor kappa |
|-------------|-------------|-------|-------|-------------|
| No vacunado | I-ELISA (+) | 83 | 14 | 0.90 |
| | I-ELISA (-) | 0 | 261 | |
| Vacunado | I-ELISA (+) | 0 | 36 | * |
| | I-ELISA (-) | 0 | 286 | |
| Total | I-ELISA (+) | 83 | 50 | 0.73 |
| | I-ELISA (-) | 0 | 547 | |

* Kappa no se calculó debido al insuficiente número de muestras positivas en este grupo.

Cuadro 7

CONCORDANCIA ENTRE RIVANOL Y FIJACIÓN DE COMPLEMENTO, USANDO SUEROS DE ANIMALES NO VACUNADOS Y VACUNADOS CON LA CEPA 19 DE *Brucella abortus* (N = 688)

| | | FC(+) | FC(-) | Valor kappa |
|-------------|--------|-------|-------|-------------|
| No vacunado | RIV(+) | 88 | 4 | 0.96 |
| | RIV(-) | 2 | 271 | |
| Vacunado | RIV(+) | 0 | 0 | * |
| | RIV(-) | 0 | 323 | |
| Total | RIV(+) | 88 | 4 | 0.96 |
| | RIV(-) | 2 | 594 | |

*Kappa no se calculó debido al insuficiente número de muestras positivas en este grupo.

Para la prueba de RIV, la sensibilidad relativa para animales no vacunados fue de 97.8%. La especificidad para los animales no vacunados, vacunados y total fue de 100% (Cuadro 3).

Tanto para la I-ELISA como para RIV, no se pudo determinar la sensibilidad para los animales vacunados por no contar con animales infectados en ese grupo.

No se determinó la concordancia entre pruebas usando sueros de animales vacunados, ya que el número de muestras positivas en este grupo fue insuficiente; sin embargo, sí se incluyeron los sueros con resultado negativo de este grupo para la determinación de la concordancia total. Para I-ELISA y RB el valor de kappa fue de 0.95 para animales no vacunados y 0.79 para el total; para I-ELISA y RIV 0.90 y 0.74; para I-ELISA y FC 0.90 y 0.73, y para RIV y FC 0.96 y 0.96, respectivamente (Cuadros 4-7).

Los VP de I-ELISA fueron 66.9% para los positivos y 100%, para los negativos, y para RIV 100% y 99.7% para positivos y negativos, respectivamente.

Discusión

El punto de corte (PC) para la prueba I-ELISA (37 PP) se determinó usando la población negativa de animales vacunados, ya que esto mejoró la especificidad de la prueba en 0.7% (de 92.1% a 92.8%). El PC es comparable al 35 PP recomendado en el protocolo del paquete sin pérdida de sensibilidad.

Se consideró el grupo de animales vacunados libres de la enfermedad en vez de la población negativa no vacunada, porque la vacunación es una práctica común en Yucatán y muchos animales vacunados no infectados se clasificarían como positivos, perdiendo especificidad en la prueba.

La sensibilidad relativa de la I-ELISA fue de 100%. La especificidad fue baja (88.5%) en la población vacunada

debido a la inhabilidad de la prueba para diferenciar animales vacunados e infectados; sin embargo, la especificidad para el grupo de animales no vacunados (98.4%) y su concordancia (kappa) con FC y RIV (0.90) indican la posibilidad de usar I-ELISA como prueba confirmatoria, posiblemente como remplazo de la más complicada FC o RIV, especialmente en áreas donde la vacunación con *Brucella abortus* S-19 no se lleva a cabo.

La baja especificidad de la I-ELISA, aunque incluye un anticuerpo monoclonal para detectar IgG1, podría explicarse por el hecho de que sólo una prueba de ELISA de captura permite el análisis preciso del isotipo de anticuerpos de un idioto tipo distinto.¹²

La prueba de RIV mostró una sensibilidad relativa de 97.8% la cual es relativamente alta; sin embargo, este resultado hace que la prueba sea poco deseable como confirmatoria en etapas finales de erradicación debido al riesgo de dejar animales falsos negativos en el hato, esto concuerda con resultados encontrados previamente en Yucatán.³

Por otro lado, la especificidad de la prueba de RIV (100%) y su concordancia con FC (0.96) son altas, dando resultados comparables con otros estudios que indican que la prueba puede ser usada para diferenciar entre títulos de anticuerpos por vacunación e infección.¹³ Los VP para RIV (100% para positivos y 99.7% para los negativos) son altos e indican que la prueba podría ser usada como confirmatoria durante el control de la brucelosis y durante etapas tempranas de erradicación.

Los VP de I-ELISA para positivos (66.9%) y negativos (100%), confirman que ésta es una prueba altamente sensible pero poco específica para las condiciones locales, por lo que podría usarse como prueba tamiz, pero con la confirmación de los resultados positivos por medio de una prueba más específica.

Un panorama más realista de la utilidad de la I-ELISA en comparación con otras pruebas serológicas, se tendrá

cuando la prueba se use en el campo y se complete un estudio de seroprevalencia en Yucatán.

Se concluye que en lugares donde la vacunación de becerras con la cepa 19 es una práctica común, como en Yucatán, se deberá utilizar la prueba de FC o por lo menos RIV para la identificación de reactores positivos, después de usar una prueba tamiz con alta sensibilidad; por ejemplo, RB o I-ELISA, las cuales son más sencillas, rápidas y baratas que FC. La prueba de RIV parece tener una alta especificidad, pero su sensibilidad no le permite identificar algunos animales infectados.

Agradecimientos

Se agradece al grupo FAO/IAEA el apoyo financiero para la ejecución de este proyecto y por proporcionar la ayuda de expertos en brucelosis, en especial la de los doctores Peter Wright, Klaus Nielsen y Carlos Jiménez. También se agradece a la QBA Sandra L. Villegas Pérez su invaluable ayuda técnica.

Referencias

1. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Memorias del Primer Symposium Internacional de Actualización en Brucelosis; 1994 marzo 11-12; México, D.F. México (DF): SARH/SSA, 1994.
2. López-Merino A, López-SR, Ocampo AD, Hernández-Monroy I, González-Domínguez F. Brucelosis, avances y perspectivas. México (DF): Publicación Técnica del IN-DRE No. 6. 1991.
3. Dajer-Abimerhi A, Gutierrez-Ruiz E, Honhold N, Zapata-Villalobos D, Villegas-Perez S. Comparison of five serological tests to detect *Brucella abortus* antibodies and a report on prevalence of the disease in livestock in the State of Yucatan, Mexico. Proceedings of the Final Research Co-ordination Meeting of the FAO/IAEA/SIDA Research Co-ordination Programme; 1990 October 22-26; Heredia, Costa Rica. Heredia, Costa Rica: FAO/IAEA, 1992:131-137.
4. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EMA, Lelenta M, Jeggo MH. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 1993;12(2):435-450.
5. Jacobson RJ, Spencer T, Edwards S, Jeggo MH, Wright. Expression and evaluation of ELISA data in serological tests used for infectious disease control in animals. Report of Joint FAO/IAEA Meeting on ELISA Data Evaluation and Expression; 1992; Viena, Austria. Viena, Austria: FAO/IAEA, 1992:1-21.
6. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in brucellosis. 2nd ed. Geneva, Switzerland, WHO, 1975.
7. Ciprian A, Mancera A, Flores R, Ramírez C. Serodiagnóstico en brucelosis. En: Morilla A, Bautista CR, editores. Manual de inmunología. México (DF): Diana, 198:193-223.
8. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Standard laboratory techniques for brucellosis diagnosis. Weybridge (UK): Central Veterinary Laboratory, 1991.
9. Thrusfield MV. Epidemiología veterinaria. Zaragoza, España: Acribia, 1990:175-186.
10. Martin SW, Meek AH, Willeberg P. Veterinary epidemiology, principles and methods. Ames (IA): Iowa State University Press, 1987.
11. Center for Disease Control. EPI INFO (computer program) version 5.01b. Atlanta (GE): Epidemiology Programme Office, CDC/World Health Organization, 1991.
12. Portsmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. J Immunol Methods 1992;150:5-21.
13. Metcalf HE. Control of bovine brucellosis in the U.S.A. In: Woods GT, editor. Practices in veterinary public health and preventive medicine in the United States. Ames (IA): Iowa State University Press, 1986:97-100.