

Diagnóstico serológico de brucelosis en caprinos: comparación de técnicas

Serological diagnosis of brucellosis in goats: comparison of techniques

CISTERNA, C.¹; CONDE, S.²; HOLLENDER, D.³; MARTINO, PE.⁴; SAMARTINO L.²

¹Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). ²Instituto de Patobiología, INTA CICVyA, Hurlingham. ³CONICET. ⁴Pathology and Microbiology Department, CIC, Veterinary College.

RESUMEN

La producción caprina representa un rubro importante dentro del sistema agropecuario de la República Argentina y la brucelosis causada por *Brucella melitensis* es considerada el motivo principal de los problemas reproductivos en esta especie. El diagnóstico de certeza se realiza aislando el agente etiológico, aunque en la práctica se evalúa el estado sanitario de un hato mediante pruebas serológicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el desempeño de las distintas pruebas serológicas tamíz y complementarias para el diagnóstico de la brucelosis caprina. Para ello, se analizaron muestras de suero de animales sin vacunación, realizando antígeno buferado en placa (BPA), rosa de bengala (RB 3 % y RB 8 %), polarización fluorescente (FPA) y pruebas de tubo y 2 mercaptoetanol (SAT/2ME). La validez de cada prueba se determinó por combinación de ELISA Indirecto (IELISA) y Fijación de Complemento (FC). BPA resultó ser más sensible, seguido de SAT/2ME, RB 3%, FPA y por último RB 8%. Al realizar FPA en serie con BPA mejoró significativamente la especificidad global. Se propone BPA como prueba tamíz, FPA como complementaria y FC e IELISA como confirmatorias. Se recomienda SAT/2ME sólo en los casos en que no sea posible la realización de las otras pruebas debido a los efectos tóxicos de los reactivos empleados para su realización.

Palabras clave: (Brucelosis), (diagnóstico), (caprinos).

Correspondencia *e-mail*: Cecilia Cisterna cecisterna@gmail.com

Recibido: 01/09/2014

Aceptado: 24/07/2015

SUMMARY

Goat production is an important item in the agricultural system of Argentina and brucellosis caused by *Brucella melitensis* is considered the main cause reproductive problems in this species. Although definitive diagnosis for this disease is made by isolation of the etiologic agent, but in practice the health status of a herd was evaluated by serological techniques indirect testing. To evaluate and compare the performance of different serological tests for diagnosis of brucellosis in goats, serum samples were analyzed. The following tests were performed: buffered plate antigen (BPA), rose bengal (RB RB 3% and 8%), fluorescence polarization (FPA) and the test tube and 2-mercaptoethanol (SAT/2ME). The validity of each test was determined in a relative manner by combination of indirect ELISA (IELISA) and complement fixation (CF). BPA was the most sensitive test, followed by SAT/2ME, 3% RB, FPA and, finally, RB 8%. FPA test, when used in series with BPA, significantly improved overall specificity. Based on these results it was proposed for brucellosis diagnosis in goats, BPA as a screening test, FPA as complementary test, and FC and IELISA as confirmatory tests. SAT/2ME is recommended only when it is not possible to perform other tests, due to the toxic effects of SAT/2ME reagents.

Key words: (Brucellosis), (diagnosis), (goats).

INTRODUCCIÓN

La brucelosis caprina es una enfermedad infecto-contagiosa crónica producida por *Brucella melitensis*, esta bacteria encuentra en el caprino a su huésped natural aunque tiene la capacidad de infectar gran cantidad de especies animales y al ser humano, constituyendo una de las zoonosis de mayor importancia en el mundo^{1,2}.

Los animales sexualmente maduros son los más afectados, siendo el signo principal el aborto en el último tercio de la gestación seguido a veces de retención de placenta y metritis supurativa. También suelen presentarse mastitis con disminución de la producción de leche y en machos orquitis asociada con infertilidad^{1,2,6}.

Estas características de presentación de la enfermedad provocan un impacto negativo en los ingresos de los productores (comúnmente de subsistencia) y en la salud pública, involucrando al puestero y su familia, que conviven en estrecho contacto con el ganado caprino, y a los consumidores de productos y subproductos (leche y queso principalmente). El diagnóstico inequívoco es el aislamiento e identificación del

germen a partir de leche, sangre y tejidos. Sin embargo, es laborioso y no siempre se logra, por lo que generalmente el diagnóstico se hace por métodos indirectos. Las pruebas de antígeno buferado en placa (BPA), rosa de bengala (RB) y fijación de complemento (FC) son las más utilizadas, seguidos de polarización fluorescente (FPA) y ELISA Indirecta (IELISA), todas utilizan como antígeno *Brucella abortus* 1119/3 y son aptas para el comercio internacional. Las pruebas de aglutinación en tubo (SAT) y 2 mercaptoetanol (2ME) no serían fiables para su uso en esta especie¹⁵. Es conocido que la FC es laboriosa, difícil de estandarizar y no puede realizarse con sueros hemolizados o anticomplementarios, sin embargo esta prueba presenta una elevada sensibilidad y especificidad. En un trabajo con cabras con aislamiento de *B. melitensis* y negativas se encontró una sensibilidad y especificidad del 100%⁸.

A partir de un brote de brucelosis caprina y humana se comparó el desempeño de las pruebas BPA, RB, SAT y 2ME, y se observó que BPA era capaz de detectar más animales positivos que las otras pruebas¹¹.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de IELISA frente a las pruebas convencionales (BPA, SAT, y 2ME), Cruz y col. observaron una muy buena concordancia con éstas sugiriendo un punto de corte en áreas sin vacunación con Rev 1 de un valor relativo de positividad (% P) igual o mayor al 30%^{5,7}. Nielsen, en dos trabajos en los cuales utilizó dos puntos de corte diferentes (12% P y 51% P), obtuvo valores de sensibilidad y especificidad relativas (BPA/FC) de 99,4% y 98,0% en el primer caso y de 96,2% y 99,7% en el segundo^{13,14}.

La prueba de FPA presenta como ventajas la rapidez en los resultados, la baja complejidad del procedimiento y que sólo reaccionan los animales infectados con la cepa de campo y no así los vacunados¹². Esta prueba mostró valores de sensibilidad de 92,7% y 88,7% y de especificidad de 99,8% y 98,9%, con un punto de corte de 88 mP^{13,14}. El punto de corte sugerido en áreas sin vacunación con Rev 1 en nuestro país es de 86 mP^{5,17}.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el desempeño de las distintas pruebas serológicas tamíz y complementarias para el diagnóstico de la brucelosis caprina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se procesaron un total de 1257 muestras de suero de caprinos no vacunados provenientes de distintos establecimientos familiares de la región centro-norte de la República Argentina (Mendoza, Tucumán, Salta, Jujuy y Santiago del Estero), los cuales fueron sometidos a las pruebas de FC, RB, SAT, 2ME, BPA, IELISA y FPA.

Clasificación de los sueros

Los sueros utilizados para este estudio fueron clasificados previamente como positivos o negativos según la combinación de IELISA y FC, el criterio utilizado fue: suero positivo= IELISA y/o FC positivo, y suero negativo= IELISA y FC negativo (Tabla 1).

Para evaluar las pruebas de BPA y RB se

analizaron un total de 1257 sueros (305 positivos y 952 negativos), para FPA 573 sueros (247 positivos y 326 negativos) y para SAT y 2ME 798 sueros (304 positivos y 494 negativos). El menor número de muestras procesadas para FPA, SAT y 2ME se debió a que la cantidad de suero de cada animal no fue suficiente para realizar todas las pruebas estudiadas. Las pruebas de SAT y 2ME fueron realizadas en paralelo y los resultados fueron expresados en conjunto como una prueba única según el siguiente criterio: suero positivo= SAT \geq 1/50 y/o 2-ME \geq 1/25 y suero negativo= SAT $<$ 1/50 y 2ME $<$ 1/25. Puntos de corte empleados: IELISA 30% de positividad, FC cualquier título y FPA 86 mP. BPA y RB se clasificaron según si aglutinaron el suero (positivo) o no (negativo).

Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas realizadas, se cargaron al programa estadístico INFOSTAT¹⁰ y se obtuvieron tablas de contingencia 2x2 para cada una de ellas (no mostradas). La validez (sensibilidad y especificidad) se determinó en forma relativa a la combinación de IELISA/FC (*Gold Standard*), en base a la elevada sensibilidad de IELISA y la elevada especificidad de FC. Para calcular estos parámetros se realizó una clasificación cruzada de pruebas como se muestra en la Tabla 2.¹⁹

Se calculó también el índice de concordancia Kappa propuesto por Cohen⁴ para las pruebas a evaluar, utilizando la siguiente fórmula: $K = Co - Ce / 1 - Ce$

Donde Co es la concordancia observada y Ce es la concordancia esperada por el azar.

$$Co = (a+d)/n$$

$$Ce = \{[(a+b)/n] \times [(a+c)/n]\} + \{[(c+d)/n] \times [(b+d)/n]\}$$

Se calcularon los intervalos de confianza (95 %) para cada uno de los índices utilizando la siguiente fórmula:

$$IC\ 95\ \% = K \pm 1,96 \times \sqrt{\frac{Co(1-Ce)}{N(1-Ce)}}$$

Tabla 1. Criterio de clasificación de los sueros utilizados

Suero	IELISA	IELISA	FC	FC	Clasificación
	+	-	+	-	
A	x		x		Positivo
B	x			x	Positivo
C		x		x	Negativo
D		x	x		Positivo

Tabla 2. Modelo de clasificación cruzada de pruebas

Prueba X	Verdaderos Positivos*	Verdaderos Negativos*	Total
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

* Relativas a IELISA/FC

Donde: Sensibilidad(x)= a/a+c y Especificidad(x)= d/b+d

Para obtener la sensibilidad y especificidad de las pruebas combinadas en serie se realizó una prueba en primer lugar (tamíz), y luego otra prueba (complementaria) sólo si el individuo resultó positivo a la primera. Al final, se consideró positivo al animal que tuvo resultados positivos en todas las pruebas y negativos a todos los demás. Mediante este método se reducen los falsos positivos y aumenta la especificidad.

Para calcular los valores de sensibilidad y especificidad en serie (RB 3% + FPA; BPA + SAT/2ME y BPA + FPA) se realizó el siguiente cálculo:

$$S_c = S_a \times S_b$$

$$E_c = 1 - (1 - E_a) * (1 - E_b)$$

Donde: Sc es la Sensibilidad de las pruebas combinadas, Sa es la Sensibilidad de la prueba a (tamíz), Sb es la Sensibilidad de la prueba b (complementaria), Ec es la Especificidad de las pruebas combinadas, Ea es la Especificidad de la prueba a tamíz y Eb es la Especificidad de la prueba b (complementaria): se utilizó el

programa estadístico INFOSTAT para graficar las curvas de sensibilidad/especificidad y el análisis de las características del operador-receptor (ROC) para FPA.¹⁰

RESULTADOS

Sensibilidad, especificidad e índice

Kappa de cada prueba

En la tabla 3 se presentan los valores de sensibilidad, especificidad e índice Kappa con su intervalo de confianza para cada una de las pruebas individuales.

Sensibilidad y especificidad de las pruebas combinadas

En la tabla 4 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad para las pruebas combinadas.

Análisis gráfico de la prueba FPA

El valor de 85,5 mP coincide con el punto donde se cruzan sensibilidad y especificidad ("Threshold") y corresponde a 88% de sensibilidad y especificidad de la prueba (Figura 1).

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas individuales

Prueba	Sensibilidad ¹	Especificidad ¹	Índice Kappa	IC 95%
BPA	98,03	96,84	0,92	0,87-0,97
RB 8%	83,93	98,84	0,86	0,81-0,91
RB 3%	95,4	98,63	0,92	0,89-0,95
SAT/2ME	97,69	97,77	0,93	0,87-0,99
FPA	87,44	90,18	0,78	0,71-0,85

¹Relativas a IELISA/FC (%)

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de las pruebas combinadas en serie

Pruebas combinadas	RB 3 % + FPA	BPA + SAT/ 2ME	BPA + FPA
Sensibilidad ¹	83,37	95,76	85,67
Especificidad ¹	99,86	99,92	99,68

¹Relativas a IELISA/FC (%)

En la curva ROC se aprecia que el valor de corte de 86 mP, corresponde a una sensibilidad de 87,4 % y especificidad de 90 % (Figura 2).

Continuando con el análisis ROC, se calcularon los valores del área bajo la curva (AUC), error estándar y p-valor (Tabla 5). El área de 0,93 significa que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo de enfermos tiene un valor de la prueba mayor que uno seleccionado aleatoriamente del grupo de sanos en el 93 % de las veces.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la prueba más sensible para el diagnóstico serológico de la brucelosis caprina es BPA, seguida en orden decreciente por SAT/2ME, RB 3 %, FPA y RB 8 %.

Todas las pruebas evaluadas presentaron un grado de concordancia muy bueno con el *Gold Standard* propuesto, excepto FPA que presentó un grado de concordancia bueno (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La brucelosis caprina continúa siendo un grave problema en la República Argentina y es necesario lograr consenso entre los distintos

organismos de sanidad animal para obtener un panorama real de su prevalencia, con el objetivo de optimizar los planes de control y/o erradicación actuales.

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en su Manual de procedimientos de Establecimientos libres de enfermedad establece que las pruebas diagnósticas a utilizar en caprinos son BPA como prueba tamíz y SAT/2ME como confirmatorias¹⁸. Sin embargo, el uso de SAT/2ME, no se recomienda por la toxicidad y efectos cancerígenos que presentan, aunque actualmente muchos laboratorios en nuestro país las utilizan como pruebas de rutina por el menor costo y facilidad de ejecución.

De acuerdo a nuestros resultados, FPA no se aconseja como prueba tamíz debido a su baja sensibilidad, sin embargo podría utilizarse como prueba complementaria.

En cuanto a RB, observamos resultados similares a los obtenidos por Blasco y Díaz Aparicio en los cuales la sensibilidad de RB aumentó de 79% a 98% ajustando la concentración celular de antígeno del 8% al

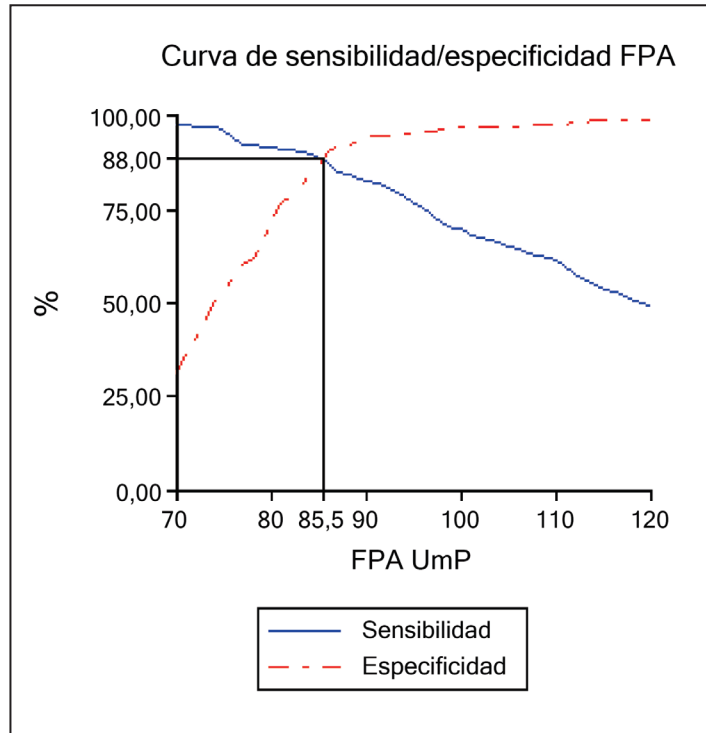


Figura 1. Curva de sensibilidad y especificidad FPA

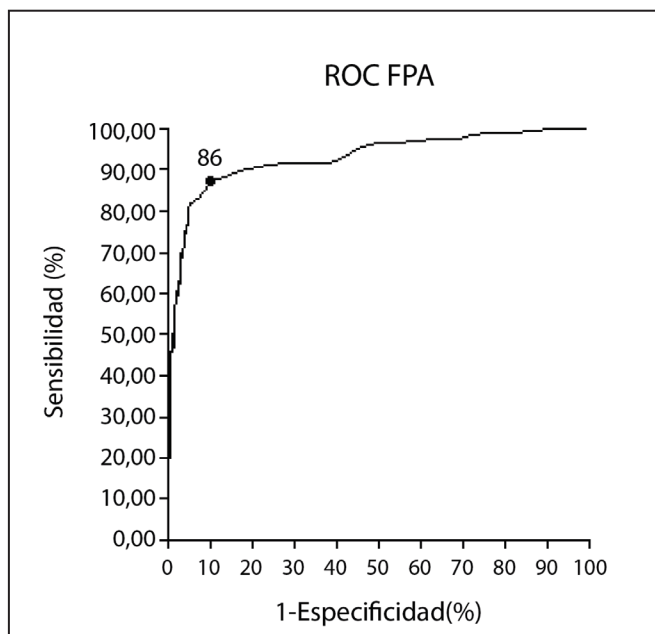


Figura 2. Curva ROC para FPA

Tabla 5. AUC
Variable: FC/IELISA

VARIABLES DE DIAGNÓSTICO	ÁREA	E.E.	p-valor
FPA	0,9311	0,0118	<0,0001

3%, siendo la especificidad en ambos casos del 100 %.^{3,8,9} Pfeiffer, en cambio obtuvo valores de sensibilidad y especificidad para RB 3% de 99,7% y 32,5% respectivamente, si bien este último valor resultó extremadamente bajo, al combinar RB con FPA ascendió a 91,2%¹⁶.

CONCLUSIONES

Se concluye que BPA debe considerarse como prueba tamíz, FPA como complementaria y FC e IELISA como confirmatorias. Se recomienda SAT/2ME sólo en los casos en que no sea posible la realización de las otras pruebas y siempre respetando las medidas de seguridad adecuadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha P.N. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2da Edición. Organización Panamericana de la Salud, Washington, USA. pp: 989.
- Alton G.G. 1990. *Brucella melitensis*. Ed. Nielsen & Duncan, Boca ratón, USA. *Animal Brucellosis*: 384-402
- Blasco, J.M.; Oarin-Bastuji, B.; Marin, C.M.; Oerbier, O.; Fanlo, J.; Jimenez de Bagués, M.O; Cau, C. 1994. Efficacy of different Rose Bengal and Complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *The Vet. Rec.* 134: 415-420.
- Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20:37-46.
- Conde S.; K. Nielsen; E. Piazza; L. Samartino. 2003. Fluorescence polarization assay performance in the diagnosis of caprine brucellosis. *Brucellosis 2003 International Research Conference including the 56 Brucellosis Research Conference*. Pamplona, España.
- Crespo León, F. 1994. *Brucelosis ovina y caprina*. Ed. Office International des Epizooties, Paris, Francia. ISBN 92-9044-342-1.
- Cruz, L., Wilde, O., de la Vega, A., Samartino, L. 2002. El test de ELISA en el diagnóstico de la brucelosis caprina en el NOA. *Veterinaria Argentina*, XIX, 188, 576-580.
- Díaz-Aparicio, E.; Marin, C.; Alonso-Unneneta, B.; Aragón, V.; Perez-Ortiz, S.; Pardo, M.; Blasco, J.M.; Díaz, R.; Moriyón, I. 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J. Clin Microbiol*, 32: 1159-1165.
- Díaz Aparicio, Efrén Blasco Martínez, José María; Suárez Güemes, Francisco. 1999. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Veterinaria México*, octubre-diciembre, año/vol. 30. pp. 307-311.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. *InfoStat versión 2010*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- González Tomé, J. S.; Saraví, M.; Samartino, L. E. 1995 "Tormenta" de abortos en un establecimiento caprino causada por *Brucella melitensis*. *Vet. Arg.* vol. XII, nº 112, pág. 89-94.
- Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas F. 1996a. A homogeneous polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Meth.* 195: 161-168.
- Nielsen K, Gall D, Smith P, Balsevicius S, Garrido F, Ferrer MD, Biancifiori F, Dajer A, Luna E, Samartino L, Bermudez R, Moreno F, Renteria T, Corral A. 2004. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Rev Sci Tech. Dec* 23(3):979-87.

14. Nielsen, K., D. Gall, P. Smith, R. Bermudez, F. Moreno, T. Renteria, A. Ruiz, L. Aparicio, S. Vazquez, A. Dajer, E. Luna, L. Samartino, and G. Halbert. 2005. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Small Rum. Res.* 56:253-258.
15. OIE Terrestrial Manual 2009NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. Chapter 2.7.2. *Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis)*
16. Pfeiffer, C; Flores, R; Padilla, C. 2009, Aplicación de la prueba de fluorescencia polarizada para la detección de brucelosis. *CIENCIA-UANL, ISSN 1405-9177*, Vol. 12, N° 3, pp. 295-304.
17. Samartino L., Conde S., Buffoni L., Gregoret R. Fluorescence Polarization assay for diagnosis of brucellosis in cattle and goats. Parma, Italia. *AAVD 2001*.
18. SENASA. 2006. *Manual de procedimientos de Establecimientos libres de enfermedad*.
19. Thursfield M. 1990. Epidemiología veterinaria. Zaragoza, España: *Acribia*.