

MONITOREO EPIDEMIOLÓGICO PARA *Brucella abortus* EN FINCAS DOBLE PROPÓSITO DEL MUNICIPIO MACHIQUES DE PERIJÁ, VENEZUELA. PARTE II: VALIDEZ Y SEGURIDAD DE LAS PRUEBAS ANILLO DE LA LECHE Y ROSA DE BENGALA

Epidemiologic Surveillance System for *Brucella abortus* in Dual Purpose Farms from Machiques de Perijá County, Venezuela. Part Two: Validity and Accuracy of Ring Test and Rose Bengal Test

Alfredo Sánchez-Villalobos ¹, Regino Villarroel-Neri ¹, Ana Oviedo-Bustos ², Gilberto Sandra ³, Julio Boscán-Ocando ¹, Roymi Pinto-Patiño ⁴, Francisco Pirela-Larrazábal ⁴, Luís Becerra-Ramírez ⁴ y Edgar López ⁵

¹ Universidad del Zulia, Unidad de Investigaciones Clínicas. E-mail: saucow33@cantv.net. ² Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral, edo. Zulia. ³ Colegio de Médicos Veterinarios del estado Zulia, seccional Machiques. ⁴ Policlínica Veterinaria Universitaria, Servicio de Consulta Externa de Grandes Animales. ⁵ Sociedad Civil Ganaderos de Machiques.

RESUMEN

Se evalúa la capacidad operativa de las pruebas diagnósticas: anillo de la leche (PAL), inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA-i), rosa de bengala (RB) y ELISA competitivo (ELISA-c), utilizadas tras 5 años (2003-2007) de vigilancia epidemiológica para brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en el municipio Machiques de Perijá, partiendo de la revalorización de un conjunto de muestras de leche y suero probados positivos y negativos. La garantía de diagnóstico previamente positivo fue alcanzada a través de evidencias epidemiológicas y positividad comprobada en suero sanguíneo al ensayo con antígeno buferado en placa y confirmación mediante fluorescencia polarizada (FP); sólo se consideraron negativos probados, los sueros y leches globales provenientes de animales negativos a FP que a lo largo del estudio no presentaron antecedentes serológicos alguno. Los resultados en leche muestran superioridad de ELISA-i versus PAL, en sensibilidad, 98,55 contra 56,52%; especificidad 99,41 y 98,82%; predicción positiva 98,58 y 95,12%; predicción negativa 99,49 y 84,84%; y cocientes de probabilidad. El nivel de concordancia entre los resultados y el verdadero estatus de las muestras fue también preferente para ELISA-i, 97,8 contra 55,3%. Las evidencias sobre sueros probados dejan en duda la contribución de RB en el diagnóstico, control y erradicación de la enfermedad en el área de estudio,

al demostrarse valores medios de validez (169,92 versus 197,21) y seguridad (171,74 versus 197,02), además de bajos coeficientes de verosimilitud entre sus resultados. ELISA-c, en cambio, mantuvo excelente capacidad diagnóstica.

Palabras clave: Brucelosis bovina, monitoreo epidemiológico, validez, seguridad, coeficiente de probabilidad, doble propósito.

ABSTRACT

The performance of the following diagnostic tests: Milk Ring Test (MRT), Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (iELISA), Rose Bengal Test (RBT) and Competitive ELISA (cELISA) used for 5 years (2003-2007) in the epidemiological surveillance system for bovine brucellosis (*Brucella abortus*) in Machiques de Perijá County was evaluated. For this purpose, milk and sera samples previously assessed through the abovementioned tests were reassessed to define their true condition (true positive or true negative). Samples were considered as true positive through epidemiological findings and a positive result in Buffered Plate Antigen Test, which was confirmed through Fluorescence Polarization Assay (FPA); samples were considered as true negative only when they were taken from FPA-negative animals that did not seroconvert during the study. Results from tests in milk showed a higher performance of iELISA versus MRT, in sensibility: 98.55 and 56.52%; in specificity: 99.41 and 98.82%; in positive predictive value: 98.58 and 95.12%; in nega-

tive predictive value: 99.49 and 84.84%; and in coefficients of probability, respectively. The level of agreement between test and true status of samples was higher in iELISA: 97.8 versus 55.3%. Results from true positive and true negative samples warrant a reappraisal of the contribution of RBT in diagnostics, control and eradication of brucellosis in the studied area, taking into account its medium values of validity (169.92 versus 197.21) and accuracy (171.74 versus 197.02), as well as its low coefficients of probability. By contrast, cELISA showed an excellent diagnostic performance.

Key words: Bovine brucellosis, epidemiologic surveillance, validity, accuracy, coefficient of probability, dual purpose cattle.

INTRODUCCIÓN

La vigilancia epidemiológica para brucellosis está fundamentada en la recolección, análisis, evaluación e interpretación del comportamiento de la enfermedad y su función principal es informar permanentemente respecto de la dinámica de ésta en una población con el fin de contribuir con los planes de control y erradicación [5, 31, 33]. Mundialmente, esos planes se basan en la vacunación de becerras y en la eliminación de animales infectados [17, 18, 24, 25, 28, 33]. Pero, se ha demostrado que es imprescindible apoyarlas con un sistema de información que sea activo y permanente [34, 36], dado que la sola implementación de esas medidas, no permite alcanzar los objetivos propuestos en los programas [28, 31, 33, 34].

El objetivo principal del monitoreo es ubicar rebaños infectados, depurarlos y mantener la supervisión sobre los limpios. Es por ello que la selección adecuada de las metodologías diagnósticas sea de gran valía. Esa valoración está estrechamente relacionada a la validez (sensibilidad y especificidad), seguridad (valores de predicción) y razón de desigualdad de las pruebas a utilizar según la fase del problema existente [3, 16, 17, 21, 31], ya que en medida que la prevalencia de brucellosis bovina disminuye, la erradicación dependerá marcadamente de la capacidad de los métodos de detección [11, 20, 24, 25, 28, 32, 33], requiriéndose distinguir eficientemente y a nivel poblacional, aquellos rebaños con infección, por baja que ésta sea; de otra forma, los progresos se interrumpen y las pérdidas se incrementan exponencialmente. Se requiere además que esas pruebas sean sencillas, de bajo costo y de fácil interpretación.

Por estas razones, los entes participantes del Sistema de Vigilancia Epidemiológica para brucellosis del municipio Machiques de Perijá (SVE), se impusieron la necesidad de investigar la capacidad operativa de las pruebas diagnósticas hasta ese momento implementadas a objeto de garantizar el continuo avance del programa de monitoreo y control de la brucellosis bovina en su territorio. Para ello, se recurrió a la data de más de cinco años de trabajo, condensada mediante un software con aplicación web diseñado por los investigadores para el manejo automatizado de los procesos de almacenamiento,

manejo de la información y generación de informes. De esa forma y tras el re-análisis de las muestras necesarias fue posible conocer de antemano a este planteamiento, el estatus verdadero de cada una de ellas frente a la brucellosis.

Motivado a que pocas veces se describen y discuten logros y conflictos que supone la implementación y desarrollo de sistemas de recolección de información y monitoreo epidemiológico que permitan diseñar estrategias a futuro, los objetivos del presente reporte se fundamentaron en evaluar la capacidad diagnóstica (validez, seguridad y verosimilitud) de la prueba de anillo de la leche (PAL), inmunoensayo enzimático indirecto en leche (ELISA-i), card test o rosa de bengala (RB) e inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-c) en la detección de rebaños y animales positivos a brucellosis, partiendo de un conjunto de muestras con estatus conocido previo, todas pertenecientes al municipio Machiques de Perijá, Edo. Zulia, Venezuela, a propósito de facilitar la toma de decisiones para el control de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Machiques de Perijá posee características de vida de bosque seco tropical, húmedo tropical y muy húmedo tropical, con temperaturas de 26 a 28°C, evaporación con valores de 1900 mm, y suelos que varían considerablemente [9, 14]. La investigación en su primera fase, retrospectiva y documental [2], requirió de la revisión exhaustiva de los resultados acumulados por el SVE, que datan de mediados de 2003, en lo concerniente a evaluación de muestras globales de leche y desde el año 2005, para sueros sanguíneos. En base a antecedentes epidemiológicos y resultados, se seleccionó un conjunto de fincas, leches y sueros problemas pertenecientes a las valoraciones del 2006.

Población y muestra

Con el fin de establecer la capacidad operativa diagnóstica de las pruebas se reevaluaron muestras de leche y suero sanguíneo con estatus serológico conocido. Por un lado, 239 muestras de leche provenientes de igual número de fincas, entre las cuales 69 se consideraron infectadas por *Brucella abortus* y 170, que se comprobaron negativas a esta problemática. El segundo conjunto estuvo integrado por muestras de suero sanguíneo de 776 animales, de los cuales 338 se clasificaron positivos. Todas ellas fueron provistas a partir del banco de muestras propio de la investigación. A objeto de la evaluación, la calificación previa se realizó en base a los siguientes criterios:

Sueros positivos: conjunto de sueros sanguíneos proveniente de fincas y animales infectados, positivos al ensayo con antígeno buferado en placa (ABP) [15, 22] y confirmados mediante fluorescencia polarizada (FP) [15, 22].

Rebaño positivo: conjunto de muestras individuales de leche provenientes de vacas infectadas, positivas a FP en le-

che y confirmadas mediante análisis de su suero sanguíneo a través de las pruebas de ABP y FP.

Animal y rebaño negativo: fueron consideradas negativas las muestras provenientes de fincas sin antecedentes epidemiológicos ni serológicos de brucelosis, por al menos cinco años consecutivos.

Los criterios descritos se sustentaron en las recomendaciones de la OIE [21, 24], que considera sólo válidas para la confirmación final de un diagnóstico de brucelosis, los resultados de las pruebas FP y ELISA-c, a las que considera superiores a cualquiera otra técnica, incluida fijación de complemento, que por años fue considerada prueba de referencia.

Unidad de análisis

Las leches provenían de porciones (aproximadamente 5 mL) de las muestras de leche globales que en el año 2006, habían sido extraídas directamente del tanque de enfriamiento de cada una de las fincas pre seleccionadas. Estas, tomadas en su oportunidad, por personal técnico entrenado siguiendo las normas COVENIN [4], adecuadamente identificada y procesadas mediante PAL y ELISA-i, se conservaban bajo congelación (Whirlpool®, 7EV070FXRQ, EUA) a - 20 grados centígrados.

Los sueros sanguíneos pre seleccionados provenían indistintamente de hembras bovinas mayores de 20 meses de edad o de grupos de toros y toretes destinados a actividades reproductivas, a los cuales se les había practicado un muestreo de sangre en el año 2006. La sangre recolectada en tubos Vacutainer®, fue sometida a centrifugación (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) a 1500 G, durante 10 minutos. Los sueros fueron congelados (Whirlpool®, 7EV070FXRQ, EUA) y procesados en su oportunidad mediante RB y ELISA-c.

Procedimiento

Las leches globales seleccionadas, unas reactivas a PAL y positivas a ELISA-i y otras negativas a ambas, habían sido preservadas bajo congelación, por lo que requirieron descongelarse a temperatura del laboratorio, para su procesamiento mediante FP. Los sueros se descongelaron de la misma forma para su reprocesamiento mediante ABP y FP, pruebas que definieron su estatus frente a la enfermedad. Todas las muestras, en base a los criterios establecidos en la investigación se separaron en grupos: positivos y negativos a brucelosis.

Pruebas serológicas

Para la identificación de las fincas positivas a partir de las muestras de leche recolectadas, se asumió -primariamente- PAL [5, 29, 34, 36, 37], la cual se fundamenta en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo [3, 24, 30, 37], donde los glóbulos de grasa presentes en la leche desplazan dicha reacción hacia la superficie de la mezcla, dando lugar a la formación de una capa (anillo) coloreada, indicativa de la presencia de anticuerpos [3, 25, 34, 36, 37]. En ausencia de

ellos, el anillo será blanco. El procedimiento de la prueba se llevó a cabo según lo señalado en el manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres de la OIE [24].

Para su posterior análisis a través de ELISA-i, las muestras de leche requirieron ser descremadas (centrifugación (Clay Adams, Serofuge 2002, EUA) a 1500 g por 10 minutos). La técnica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (Boomelli-Idexx, EUA), utilizando microplacas previamente sensibilizadas con el antígeno inactivado, monofásico de *Brucella abortus* (cepa 1119) inmovilizado sobre policubetas de poliestireno de 96 pocillos [23-25, 29, 31, 32, 34, 36, 37]. Los resultados fueron leídos en un espectrofotómetro Elx 800 (Bio-Tek Instruments®, EUA) a 405 nm. Las densidades ópticas (DO) de las muestras problemas en duplicado fueron promediadas y corregidas por sustracción de la DO del control negativo, estas fueron divididas por las DO de los controles positivos por 100. Se consideraron positivas aquellas sobre 100 y negativas bajo 70%.

La prueba RB se basa en una reacción antígeno-anticuerpo con inhibición de algunas aglutinaciones inespecíficas a pH bajo. Se empleó un antígeno coloreado corpuscular de 8% de concentración celular en una solución tope a pH 3,6, proveniente de BIOINIA de Venezuela. El procedimiento de la prueba se llevó a cabo según lo señalado en el manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres de la OIE [24]. Los animales positivos a RB fueron evaluados mediante ELISA-c.

El ELISA-c utilizado (SVANOVIR® *Brucella abortus*, Svanova Biotech, Suecia) fue diseñado para detectar anticuerpos específicos contra *Brucella abortus*, pudiendo distinguir entre animales infectados y animales vacunados con cepa 19 [11, 20, 21, 26]. El procedimiento de la prueba se ajustó a lo señalado por el fabricante. La densidad óptica fue medida en un fotómetro Elx 800 (Bio-Tek Instruments®, EUA) a 450 nm [3, 20, 27]. Tras el análisis, se calcularon los valores de densidad óptica (DO) para los controles y las muestras, que conllevaron al porcentaje de inhibición (PI) para las muestras y para los controles de la siguiente manera:

$$PI = 100 - (DO \text{ del control o muestra} \times 100 / DO \text{ del Control del Conjugado})$$

Inicialmente, las muestras con PI mayor o igual a 30% se consideraron positivas. La validez de la prueba se estableció según criterios del fabricante. A objeto de la investigación, el valor de corte fue re-calculado en base los resultados obtenidos de las muestras provenientes de los animales negativos. El promedio PI obtenido del análisis se incrementó en 3 desvíos estándares y se utilizó para la discusión de los resultados totales de la investigación, a propósito de ampliar el análisis comparativo entre las pruebas diagnósticas.

El antígeno para la prueba de ABP provino de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, preparada en suspensión taponada a una concentración celular del 11%, y un pH ajustado a

3,70 +/- 0,03. La técnica se ejecutó siguiendo las recomendaciones del manual terrestre de la OIE [24]. Cualquier reacción visible se consideró positiva [21, 24]. El ensayo de FP se fundamenta en la medición comparativa de la velocidad de movimiento de las moléculas fluorescentes; ésta resulta inversamente proporcional a su tamaño. Así, 10 µL de cada suero sanguíneo problema fue diluido en 1 mL de solución buffer y sometido -tras incubación por 5 minutos- a una lectura inicial en un equipo portátil (Sentry 100, Diachemix DLL, EUA). A esta mezcla, se agregaron 10 µL del antígeno conjugado con fluoresceína, y sometida a una segunda lectura dos minutos después. El resultado fue expresado en unidades de milipolarización (mP). La prueba fue considerada válida cuando los controles de efectividad del fabricante, respecto a los controles negativos y positivos, se mantuvieron dentro de los valores estándares. Se consideraron positivas todas las muestras de suero cuyo diferencial con el valor promedio del control negativo fue igual o superior a 10 mP; en el caso de las leche, ese diferencial se amplió sobre 20 mP.

Análisis estadísticos

Las informaciones procedentes de la investigación se organizaron, analizaron y presentaron mediante elementos de estadística descriptiva [2], lo que permitió definir de forma precisa las variables estudiadas. Se determinó la proporción de positivos y negativos a cada prueba. Los datos concernientes se presentaron en Tablas. Los resultados comparativos entre pruebas fueron estudiados utilizando el programa Win Episcoppe 2,0 [6, 35], al igual que la determinación de los puntos de corte (cut-off) de los ensayos y parámetros estadísticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Leches con estatus conocido

Los productos generales de la investigación en leche se detallan en la TABLA I. Se evidencia que sobre muestras probadas positivas, ELISA-i mostró mayor competitividad al identificar de forma asertiva 68 de las 69 fincas, mientras PAL sólo identificó 39 de ellas. Sin embargo, en relación al conjunto de muestras negativas no se observó un comportamiento diferente entre dichos ensayos, aunque debe destacarse que ELISA-c fue ligeramente superior. Las TABLAS II y III desglosan los valores obtenidos por estas pruebas de forma individual frente al reto propuesto, lo cual permite una evaluación calificada de sus capacidades diagnósticas. Cabe destacar, la diferencia evidente en cuanto al parámetro sensibilidad entre ambas pruebas (56,52 vs. 98,55) y los valores de la J de Youden (55,3 y 97,9%), lo cual refleja mayor validez de los resultados de ELISA-i, con estrecha concordancia con la realidad, frente a los obtenidos por PAL.

El cociente de probabilidad positivo en PAL, TABLA II, alcanzó una cifra promedio media-baja de 49,04, con un valor máximo esperado de 193,51 puntos. En el caso de ELISA-i, TA-

**TABLA I
RESULTADOS GENERALES DE LOS ENSAYOS EN LECHE: MUESTRAS GLOBALES CON ESTATUS CONOCIDO Y DE FINCAS DOBLE PROPÓSITO DEL MUNICIPIO MACHIKES DE PERIJÁ/GLOBAL RESULTS OF TESTS IN MILK: SAMPLES FROM DUAL PURPOSE FARMS WITH KNOWN STATUS LOCATED IN MACHIKES DE PERIJÁ COUNTY**

Año 2006	PAL	ELISA-i	Totales
Leche Positiva	39	68	69
Leche Negativa	168	169	170

**TABLA II
VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE ANILLO EN LECHE SOBRE MUESTRAS DE REBAÑOS CON ESTATUS CONOCIDO DEL MUNICIPIO MACHIKES DE PERIJÁ/EVALUATION OF RING TEST IN SAMPLES FROM DUAL PURPOSE FARMS WITH KNOWN STATUS LOCATED IN MACHIKES DE PERIJÁ COUNTY**

		Estatus Rebaño		
		BRC +	BRC -	
PAL	Pos	39	2	41
	Neg	30	168	198
Total Fincas		69	170	239

Capacidad Diagnóstica de PAL

Parámetro	Valor Promedio	Límite Inferior	Límite Superior
Sensibilidad	56,52	44,8	68,2
Especificidad	98,82	97,2	100
Valor Predictivo Positivo	95,12	88,5	100
Valor Predictivo Negativo	84,84	79,8	89,8
Cociente Probabilidad +	48,04	11,93	193,51
Cociente Probabilidad -	0,43	0,34	0,58
J de Youden	0,553	0,43	0,67

BLA III, la media estadística fue de 167,53 con un máximo de 1182,8 puntos. En ambos casos se muestra una superioridad numérica de ELISA-i, que -al menos- cuadruplica los resultados de PAL. Esta medición posee especial significado práctico, al revelar independiente de la prevalencia de la enfermedad, la capacidad de relacionar positividad con enfermedad. Este índice señala que un resultado positivo en ELISA-i es 168 veces más probable en una muestra proveniente de un rebaño con brucelosis que en una procedente de uno sano, y que un resultado negativo es apenas probable en un rebaño infectado.

Otros investigadores han argumentado que las diferencias entre los alcances de esas técnicas responden a un número importante de falsos negativos en PAL [3, 16, 34], dados principalmente por su baja sensibilidad comparativa. Las cifras de validez (sensibilidad, especificidad), seguridad (valores de predicción) y verosimilitud (razones de probabilidad) encontrados para PAL en fincas probadas del municipio Machiques de Perijá son compara-

TABLA III

VALORACIÓN DE ELISA-i SOBRE MUESTRAS DE REBAÑOS CON ESTATUS CONOCIDO DEL MUNICIPIO MACHIQUES DE PERIJÁ/ EVALUATION OF ELISA IN SAMPLES FROM DUAL PURPOSE FARMS WITH KNOWN STATUS LOCATED IN MACHIQUES DE PERIJÁ COUNTY

		Estatus Rebaño		
		BRC +	BRC -	
ELISA-i	Pos	68	1	69
	Neg	1	169	170
Total Fincas		69	170	239

Capacidad diagnóstica de ELISA-i

Parámetro	Valor Promedio	Límite Inferior	Límite Superior
Sensibilidad	98,55	95,7	100
Especificidad	99,41	98,2	100
Valor Predictivo Positivo	98,58	95,7	99,9
Valor Predictivo Negativo	99,49	98,2	99,9
Cociente Probabilidad +	167,53	25,73	1182,8
Cociente Probabilidad -	0,01	0	0,1
J De Youden	0,979	0,949	1,00

bles a las definidas por Nielsen y col. [21, 23] en estudios realizados en Canadá. Resultados con valores mayores también han sido publicados [30, 34, 36, 37], pero las diferencias pueden explicarse por el tamaño de la muestra sometida a prueba. Respecto a ELISA-i en leche, Vanzini y col. [36, 37] obtuvieron una sensibilidad del 99,6% y una especificidad del 99,1%, valores que, según los autores, apoyan la inclusión de la ELISA-i en leche como prueba de paneo en programas de vigilancia epidemiológica y de control de la enfermedad.

Sueros con estatus conocido

Los resultados de la investigación sobre sueros sanguíneos con estatus previo conocido, TABLA IV, permitió la comparación indirecta entre RB y ELISA-c, TABLA V y VI. La capacidad diagnóstica de RB, determinada por la validez de sus resultados, fue de 169,92. Mientras, que para ELISA-i representó 197,21 sobre un valor máximo de 200 puntos. Ello refleja la superioridad de este ensayo en la clasificación acertada de positivos y negativos en relación al verdadero estatus de los animales. Respecto a la medición de seguridad, determinada por la suma de los valores de predicción positivo y negativo, las cifras (171,74 vs. 197,02) indican igualmente ventaja por parte de ELISA-c. Los valores de predicción encontrados para RB refieren una proporción de falsos positivos de 9,4%, mientras la proporción de falsos negativos alcanza el 20,7%, por lo que cabe esperar, tras su utilización, un importante error diagnóstico [12, 13]. Estos mismos parámetros para ELISA-c corresponden a 1,6 y 1,2%, respectivamente, lo que ratifica su ventaja competitiva.

TABLA IV

RESULTADOS GENERALES DE LOS ENSAYOS EN SUEROS SANGUÍNEOS: MUESTRAS PROVENIENTES DE ANIMALES CON ESTATUS CONOCIDO Y DE FINCAS DOBLE PROPÓSITO DEL MUNICIPIO MACHIQUES DE PERIJÁ/ GLOBAL RESULTS OF TESTS IN SERA: SAMPLES FROM CATTLE WITH KNOWN STATUS LOCATED IN DUAL PURPOSE FARMS OF MACHIQUES DE PERIJÁ COUNTY

Año 2006	RB	ELISA-c	Totales
Suero Positivo	268	334	338
Suero Negativo	41	431	438

TABLA V

VALORACIÓN DE RB SOBRE MUESTRAS CON ESTATUS CONOCIDO DEL MUNICIPIO MACHIQUES DE PERIJÁ/ EVALUATION OF RBT IN SAMPLES WITH KNOWN STATUS FROM MACHIQUES DE PERIJÁ COUNTY

		Estatus Conocido		
		BRC +	BRC -	
RB	Pos	268	41	309
	Neg	70	397	467
Total Fincas		338	438	776

Capacidad diagnóstica de RB

Parámetro	Valor Promedio	Límite Inferior	Límite Superior
Sensibilidad (%)	79,29	74,9	83,6
Especificidad (%)	90,63	87,9	93,4
Valor Predictivo Positivo (%)	86,73	82,5	90,5
Valor Predictivo Negativo (%)	85,01	81,5	88,2
Cociente Probabilidad +	8,47	6,3	11,39
Cociente Probabilidad -	0,22	0,19	0,88
J de Youden	0,693	0,648	0,750

En casos como el presente, cuando se trata de enfermedades sin tratamiento curativo y además, contagiosas, la identificación acertada de los animales negativos juega importante papel para el logro de los propósitos perseguidos en los programas de control y erradicación de la problemática. Entonces, estas evidencias abren una profunda incógnita en relación al papel que RB viene cumpliendo como prueba primaria o de paneo para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Cabe recordar que la legislación vigente en Venezuela [10] define a RB como prueba oficial de campo, mientras deja a ELISA-c, prueba lenta en tubo, 2 mercapto-etanol y/o fijación de complemento para confirmación definitiva del diagnóstico.

De esa resolución se deduce que el diagnóstico debe realizarse utilizando al menos dos pruebas, por lo que sólo se consideran infectados aquellos animales previamente positivos a RB, confirmados mediante otro examen [10]. Ese esquema diagnóstico, donde la realización de pruebas confirmatorias

TABLA VI
VALORACIÓN DE ELISA-c SOBRE MUESTRAS CON
ESTATUS CONOCIDO DEL MUNICIPIO MACHIKUES DE
PERIJÁ/ EVALUATION OF c-ELISA IN SAMPLES WITH KNOWN
STATUS FROM MACHIKUES DE PERIJÁ COUNTY

		Estatus Conocido		
		BRC +	BRC -	
ELISA-c	Pos	334	7	341
	Neg	4	431	435
Total Fincas		338	438	776

Capacidad diagnóstica de ELISA-c			
Parámetro	Valor	Límite	Límite
	Promedio	Inferior	Superior
Sensibilidad (%)	98,81	97,0	99,5
Especificidad (%)	98,40	96,7	99,2
Valor Predictivo Positivo (%)	97,94	95,8	99,0
Valor Predictivo Negativo (%)	99,08	97,7	99,2
Cociente Probabilidad +	61,83	29,63	128,94
Cociente Probabilidad -	0,01	0	0,1
J de Youden	0,972	0,955	0,988

depende de los resultados de otra previa, conduce a un diagnóstico bajo un criterio en serie, cuyo mayor riesgo consiste en no diagnosticar a algunos enfermos [20, 27]. En cambio, pocos animales sanos serán considerados como enfermos.

Las evidencias reveladas en esta investigación tienen graves repercusiones al momento del análisis rutinario de sueros sanguíneos provenientes de fincas sin previo conocimiento de su estatus, ya que sólo se reevalúan las reaccionantes a RB, desconociendo que un importante número de animales no reaccionantes pueden corresponderse con falsos negativos, y no ser eliminados de los rebaños, causando graves retraso y pérdidas económicas cuantiosas a la ganadería.

Algunas experiencias demuestran que sueros sanguíneos, previamente negativos a RB, resultan positivos a ELISA-c. Estos resultados, en virtud de las comprobaciones aquí realizadas, se clasificaron como falsos negativos a RB y se consideraron consecuencia directa de una infección incipiente o a la presencia de una escasa cantidad de IgG, y se atribuyeron a la baja sensibilidad de RB, que explica el sesgo importante que se produce al ser utilizada como prueba primaria de diagnóstico. Caso contrario, se atribuye a ELISA-c la capacidad de medir anticuerpos clase IgG1, aunque éstos se encuentren en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas [7, 20, 21].

El caso contrario pareciera no tener las implicaciones anteriores, siempre que se proceda a la realización de pruebas confirmatorias, así casos positivos a RB que resultasen negativos mediante ELISA-c, se consideraron negativos a brucelosis y se clasificaron como falsos positivos a RB, ya que los anticuerpos detectados no correspondían a *Brucella abortus* [1, 12, 13,

19]. Este tipo de resultado se ha asociado a la detección de residuos de anticuerpos provenientes de la vacunación con Cepa 19 [1, 7, 18, 27], razonamiento al cual apunta el estudio epidemiológico de varias fincas del área en estudio. Posterior a la vacunación de las becerras con cepa 19, entre 3 y 8 meses de edad reglamentaria de vacunación en Venezuela [10], se produce una respuesta primaria con una producción mayor de IgM que disminuye a los 20 meses de edad. Si las mismas son expuestas a las cepas de campo, desarrollan una respuesta secundaria con predominio de IgG y muy baja cantidad de IgM. Pero cuando la vacunación con cepa 19, se realiza más allá de los 8 meses de edad se pueden encontrar niveles, tanto de IgM como de IgG, que interfieren con los resultados de las pruebas serológicas trayendo como consecuencia fallas en la interpretación [7, 18, 38], o bien, estos falsos positivos pudiesen deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas que comparten un lipopolisacárido superficial similar al que presenta *Brucella* [13, 19-21, 27]. Dentro de estas bacterias se puede citar a *E. coli* O:116 y O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella* serotipos Kauffman-White del grupo N, *Pseudomonas maltophilia* y *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9. Aunque, la presencia de tales desavenencias han sido desestimada [1] al asumirme que RB detecta IgG1 e IgG2, sin detectar IgM. Siendo esta última inmunoglobulina, la causante de reacciones cruzadas con diferentes microorganismos con los cuales comparten epitopes a nivel de la cadena O.

Estas experiencias ponen en entredicho los beneficios que pueda estar brindando RB como prueba primaria en la identificación (diagnóstico) de animales infectados, especialmente debido a la baja prevalencia aparente de la enfermedad en la zona de estudio. Es importante recordar que varios autores [11, 20, 38] argumentan que la validez de esta prueba de aglutinación muestra verdadera eficiencia en áreas con alta prevalencia de la enfermedad, que en zonas de baja positividad, como parece ocurrir en el municipio Machiques de Perijá.

Punto de corte para ELISA-c

Otro aspecto de importancia, con íntima relación con los precedentes, tiene que ver con la definición del punto de corte para la prueba ELISA-c, la cual dada su alta especificidad, definen -dentro de las opciones existentes- por sí sola, el estado de salud o enfermedad de los animales individualmente [20]. Este punto de corte, de acuerdo a lo sugerido por el laboratorio fabricante, se estableció en un porcentaje de inhibición igual a 30%, lo que determinó que todo resultado igual o superior a esta cifra fuera considerado positivo. Sin embargo, los resultados acumulados de la vigilancia sugieren que dicho punto de corte puede no estar adaptado a las condiciones existentes en la zona de estudio, donde la brucelosis bovina es endémica y se realiza vacunación con Cepa 19, representando un cierto contacto de todos los animales con la *Brucella* como antígeno, lo cual conlleva a que la presencia, tipo y calidad de anticuerpos sea variable. Entonces, aunque sin enfermar, los animales pueden generar cierta cantidad de inmuno-

TABLA VII
**CÁLCULOS PRELIMINARES DEL PUNTO DE CORTE PARA LA PRUEBA DE ELISA COMPETITIVO/
 PRELIMINARY CALCULATIONS FOR DETERMINING COMPETITIVE ELISA CUT-OFF POINTS**

Porcentaje de inhibición promedio de las muestras negativas (PROM)	Desviación estándar del PROM (DE)	PROM + 2(DE)	PROM + 3(DE)	2,5 veces PROM
11,60%	7,24%	26,08%	33,32%	29,00%

globulinas pesquisables por técnicas altamente sensibles como lo son ELISA-c y FP, aunque en valores trazas fluctuantes entre sangrados dentro de márgenes de negatividad que deben ser comprobados.

Partiendo de los resultados alcanzados por ELISA-c sobre el subconjunto de sueros sanguíneos negativos se procedió a dicha revisión, TABLA VII. De acuerdo a las investigaciones precedentes, ese cálculo puede lograrse por diferentes vías directas [8, 30, 36]. La primera, por simple expresión de 2,5 veces la media obtenida para los animales negativos [29] o, la segunda, por la sumatoria del promedio de los porcentajes de inhibición más dos [30] o tres veces la desviación estándar de dicho cálculo [26]. Cualquiera de las cifras o métodos sugiere que el umbral de separación entre negatividad y enfermedad se encuentra, probablemente, muy cerca de la recomendación del fabricante. Sin embargo, debe destacarse que, estas proyecciones proponen que valores por encima de un PI de 26%, requieren monitoreo permanente a fin de definir, mediante muestras pareadas, su verdadero estatus frente a la enfermedad.

Bajo ese resultado, sólo resultarían positivas las muestras con valores superiores a un porcentaje de inhibición 33%. Si bien, la redefinición requiere de un trabajo de investigación mucho más amplio que incluya evaluación de curvas ROC, reconocería las diferencias de prevalencia existentes en distintas zonas geográficas de la región y permitirá emprender políticas precisas en casos especiales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis y evaluación de los resultados presentados permite señalar que para las condiciones epidemiológicas presentes en el municipio Machiques de Perijá, ELISA-i mostró excelente capacidad operativa para la identificación, monitoreo y seguimiento de la brucelosis a través de muestras globales de leche provenientes de tanques de enfriamiento de las fincas. Esta calificación queda demostrada por las evidencias en relación a los parámetros: validez, seguridad y verosimilitud medida frente a los subconjuntos de poblaciones probadas. PAL demostró inferioridad comparativa ante ELISA-i y valores de concordancia medios frente a las situaciones planteadas.

Se comprueba que RB posee importantes limitantes para su empleo como prueba de paneo en el diagnóstico de la enfermedad dentro del área de estudio. Estas restricciones provienen de sus alcances medios frente al reto que representó la investigación, pero manifestados especialmente por la po-

sibilidad de errores en el diagnóstico, directamente relacionados a la alta proporción de falsos positivos y negativos al que conduce su utilización, lo cual puede estar comprometiendo la viabilidad del programa de control y erradicación que se ejecuta en la región. Sobre ELISA-c, al contrario, se comprueba extraordinaria capacidad operativa con altísima concordancia con el estatus verdadero de las muestras y mínimo error diagnóstico.

En relación a la evaluación del valor umbral para definición de la condición de los animales sobre la enfermedad mediante ELISA-c, los valores calculados señalan cifras que fluctúan entre 26,08 y 33,32%, lo cual sugiere que el valor de corte indicado por el fabricante del kit utilizado, responde a las condiciones del área en estudio, y a su vez emite un alerta respecto a la necesidad de monitorear (muestras pareadas) animales con resultados por encima 26 PI.

AGRADECIMIENTO

Los resultados mostrados se derivan de los trabajos del "Sistema de Vigilancia Epidemiológica para brucelosis del municipio Machiques de Perijá" (SVE), y han sido posibles gracias a la colaboración de la Sociedad Civil Ganaderos de Machiques (GADEMA), Colegio de Médicos Veterinarios del estado Zulia seccional Machiques, Servicio Autónomo de Sanidad Animal, Ministerio de Sanidad y, muy especialmente, al conjunto de empresas lácteas de la región. El SVE ha sido cofinanciado por GADEMA, las industrias lácteas y la Comisión de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia (CONDES LUZ).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUIRRE, N.P.; VANZINI, V.R.; DE ECHAIDE, S.T.; VALENTINI, B.S.; DE LUCCA, G.; AUFRANC, C.; CANAL, A.; NIELSEN, K. Antibody dynamics in Holstein friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. **J. of Immunoss. and Immunoch.** 23 (4):471-478. 2002.
- [2] ARGIMON-PALLÁS, J.M.; JIMÉNEZ-VILLAS, J. Contextos de la investigación en ciencias de la salud. **Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica.** 3era Ed. Madrid. 1-404 pp. 2004.
- [3] ALONSO, B.; BAGNAT, E.; MANETTI, J.; NICOLA A. Pruebas Serológicas. **Manual de procedimientos téc-**

- nicos de diagnóstico de Brucelosis bovina.** Versión 2,0. Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 70pp. 1978.
- [4] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES: COVENIN. Métodos para la toma de muestras. **Leche y productos lácteos**, Norma 938-83. Fondonorma. 1-22pp. 1983.
- [5] CRUZ, M.L.; BASCO DE D, M.; WILDE, O.R.; RABASA DE SAL, A. Prevalencia de la Brucelosis Bovina en la Cuenca Lechera de la Provincia de Tucumán, **Vet. Argent.** 13 (130):703-707. 1996.
- [6] DE BLAS, N.; ORTEGA, C.; FANKENA, K. Win episcopo 2,0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Vet. Rec.** 148 (18):567-572. 1998.
- [7] D'POOL, G.; PIRELA, S. R.; TORRES, T.; PÉREZ, M.; GARCÍA, A.; CASTEJÓN, O.; ROJAS, N. Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ FCV- LUZ.** XIV (2):168-176. 2004.
- [8] EMMERZAAL, A; DE WIT, J. J.; DIJKSTRA, T.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F. G. The Dutch Brucella abortus monitoring programme for cattle: the impact of false-positive serological reactions and comparison of serological tests. **Vet. Q.** 24 (1):40-6. 2002.
- [9] FUERNAYOR, W. **Atlas del estado Zulia. Síntesis Socio Histórico y Cultural.** Universidad del Zulia. Facultad de Humanidades y Educación. Departamento de Geografía. Mapoteca Agustín Codazzi. 4ª Ed. 96-113pp. 1998.
- [10] GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA. Resolución 127. Normas para el programa de prevención, control y prevención de la brucelosis. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. 2003.
- [11] GARCÍA C., C. Brucelosis Animal y humana en las Américas. **Pruebas suplementarias para el diagnóstico de la brucelosis.** Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica No. 25. OMS. Buenos Aires, Argentina. 56pp. 1982.
- [12] GERBIER, G.; GARIN-BASTUJI, B.; POUILLOT, R. False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of Yersinia enterocolitica serotype O:9 in a field trial. **Vet. Res.** 28 (4):375-383. 1997.
- [13] GODFROID, J.; SAEGERMAN, C.; WELLEMANS, V. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when inespecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Vet. Microb.** 90 (1-4):461-477. 2002.
- [14] JAIMES, E.J.; PINEDA, N.; MENDOZA, J. Homogeneidad mesoclimática de algunas zonas de vida de Venezuela. **INCI** 31 (11):772-786. 2006.
- [15] JENSEN, A. L. Alternative ways of evaluating test results. **Revue Méd. Vet.** 151 (7):593-599. 2000.
- [16] LÓPEZ, J.; BEST, A.; MORALES, C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región) **Arch. de Med. Vet.** 30 (1):133-138. 1998.
- [17] LOPETEGUI, P. Bovine brucellosis control and eradication programme in Chile: vaccine use as a tool within the programme. **Dev. in Biol.** 119:473-9. 2004.
- [18] LORD, V. R.; SCHURIG, G.G.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; MARCANO M. J.; MELENDEZ, G. E. Field study of vaccination of cattle with Brucella abortus strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. **Am. J. Vet. Res.** 59(8):1016-20. 1998.
- [19] MAINAR-JAIME, R.C.; MUÑOZ, P. M.; DE MIGUEL, M. J.; GRILLÓ, M. J.; MARÍN, C. M.; MORRIÓN, I.; BLASCO, J. M. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in Brucella-free farms showing false positive serological reactions due to Yersinia enterocolitica O:9. **Can Vet. J.** 46(10):913-6. 2005.
- [20] MCGIVEN, J.A., TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A. P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to Brucella abortus in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and Ielisa. **J. of Immunol. Meth.** 278 (1-2):171-178. 2003.
- [21] NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.; NICOLETTI, P.; ELZER, P.; ROBLES, C.; BERMUDEZ, R.; MINAS, A. Towards single screening tests for brucellosis. **OIE Revue Scientif. et Tech.** 24 (3):1027-1038. 2005.
- [22] NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Vet. Microb.** 90 (1-2):447-459. 2002.
- [23] NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. **Vet. Microb.** 52 (1-2):165-173. 1996.
- [24] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Brucelosis bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 445-476pp. 2006.
- [25] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Brucelosis. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** Publicación científica y técnica 580. 3ra Ed. 28-56pp. 2001.
- [26] POESTER, F.P.; GONCALVES, V.S.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):55-62. 2002.
- [27] RAMÍREZ, M.; ERNST, S.; ELVINGER, F.; RIVERA, A.; ROSENFELD, C. Respuesta serológica y tiempo de saneamiento en rebaños bovinos con brucelosis vacuna-

- dos con Cepa 19 o Cepa RB51; X Región, Chile. **Arch. Med. Vet.** 34 (2). 2002.
- [28] RENTERÍA, T.; NIELSEN, K.; FEDOROVISH, A.; MONTAÑO, M.; MORENO, J. Evaluación de un programa de control de la brucelosis bovina en hatos lecheros de Baja California. **Téc. Pec. Méx.** 8 (41): 275-282. 2003.
- [29] RIVERA, S.; CURIEL, J. Epidemiología Serológica de la Brucelosis Bovina en el Municipio Rosario de Perijá, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** V (2):174-1124. 1993.
- [30] RIVERA, D.Y.; RUEDA, O.E.; CALDERÓN, C.P.; MARIÑO, O.C.; GALL, D.; NIELSEN, K. Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbant assay in milk for the detection of cattle infected with *Brucella abortus*, in herds located in the province of Cundinamarca, Colombia. **Rev. Sci. Tech.** 22(3):1065-75. 2003.
- [31] RIVERA, S.A.; RAMÍREZ, M.C.; LOPETEGUI, I.P. Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):45-53. 2002.
- [32] SAMARTINO, L.E. Brucellosis in Argentina. **Vet. Microbiol.** 90 (1-4):71-80. 2002.
- [33] SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO, CHILE. Procedimientos de Erradicación de Brucelosis Bovina. Programa Oficial de Erradicación de Brucelosis Bovina. Anexo 2, 33pp. 2004.
- [34] SILVA J., F.; MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; PINTO, J.P. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.** 59 (2):295-300. 2007.
- [35] THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J. P.; FRANKENA, K. Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. **Vet. Rec.** 148 (18):567-572. 2001.
- [36] VANZINI, V.; AGUIRRE, N.; VALENTINI, B.; TORIONI DE E., S.; LUGARESI, C.; MARCHESINO, M.; NIELSEN, K. Comparison of and indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Vet. Microbiol.** 82:55-60. 2001.
- [37] VANZINI, V.; AGUIRRE, N.; LUGARESI, C.; TORIONI DE E., S.; CANAVESIO, V. G.; GUGLIELMONE, A.; MARCHESINO, M.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. **Prev. Vet. Med.** 36:211-217. 1998.
- [38] VARGAS, F. Brucellosis in Venezuela. **Vet Microbiol.** 90 (1-4):39-44. 2002.