

## Comparación de las pruebas rosa de bengala y rivanol con elisa para el diagnóstico de brucelosis bovina - Comparing the rosa de bengala and rivanol in the elisa test for diagnosis of bovine brucellosis

**Mejía Martínez, K<sup>1</sup>.; Lemus Flores C<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> CA Nutrición y biotecnología agropecuaria- Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit.

<sup>2</sup> Posgrado CBAP- Unidad Académica de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Email: [karinamej@hotmail.com](mailto:karinamej@hotmail.com)

### Resumen

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que puede impactar fuertemente en el ámbito económico, además de representar un problema de salud pública. En México, el diagnóstico oficial obligatorio se realiza por serología, mediante las pruebas de tarjeta rosa de bengala, rivanol y fijación de complemento, considerándose el aislamiento y caracterización de *Brucella spp* como la "prueba de oro". En este estudio se comparó el resultado de las técnicas serológicas de tarjeta (RB) y rivanol (RIV) con la prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) cualitativo y cuantitativo para el diagnóstico de la brucelosis. Se utilizaron sueros sanguíneos de 50 hembras de bovinos adultos procedentes del rastro municipal de las cuales 25 mostraron resultados negativos a la prueba RB y 25 con resultados positivos a las pruebas RB y RIV con diferentes titulaciones. Se determinó la sensibilidad y la especificidad relativa de las pruebas con respecto a ELISA-I. La concordancia se determinó mediante el análisis kappa. RB mostró una sensibilidad de 96% y una especificidad del 100%. RIV tuvo una sensibilidad del 88%. La concordancia (kappa) entre RB y ELISA-I fue de 0.96, entre RIV y ELISA-I de 0.88; sin embargo a la prueba de  $X^2$  hay una significancia  $P < 0.07$  al comparar la sensibilidad de RIV, sugiriendo que las muestras con títulos bajos a RIV pudieran representar anticuerpos vacunales que ELISA-I considera muestras negativas. ELISA-I es una prueba complementaria para animales positivos que puede mejorar la sensibilidad en el diagnóstico de *Brucella abortus*.

**Palabras clave:** Bovinos | Brucelosis | ELISA | sangre.

## Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease that can have a strong impact on the economy and it represents a public health problem. In Mexico, the official diagnosis is made mandatory by serology, using the card test, rivanol and complement fixation, considering the isolation and characterization of *Brucella* spp as the "gold standard". In this study serological techniques card test (CT) and rivanol (RIV) viceverse ELISA (Enzyme Linked immunoabsorbent Assay) were compared, for the qualitative and quantitative diagnosis of brucellosis. It were used sera from 50 female adult cattle from the municipal slaughterhouse of which 25 showed negative test to CT and 25 showed positive test results to CT and RIV with different titers. It was determined too the relative sensitivity and specificity of the CT and RIV test with respect to ELISA test. Matching it was determined using kappa analysis. CT showed a sensitivity of 96% and a specificity of 100%. RIV it had a sensitivity of 88%. Matching of kappa test between CT and ELISA it was 0.96; between RIV and ELISA of 0.88, but the significance of  $X^2$  test it was  $P < 0.07$  when comparing sensitivity of RIV, suggesting that samples with low titers of RIV could represents vaccine antibodies, which ELISA it considers as a negative samples. ELISA is a complementary test for positive animals that can improve the sensitivity in the diagnosis of *Brucella abortus*.

**Key words:** Cattle | Brucellosis | ELISA | blood.

## INTRODUCCIÓN

La Brucelosis es una antropozoonosis de origen animal que por sus características epidemiológicas y evolutivas, genera un importante impacto social y económico; ocasiona enormes pérdidas a la industria pecuaria y representa un verdadero riesgo ocupacional para las personas que trabajan con derivados pecuarios o que consumen productos crudos provenientes de animales infectados. La patología en animales y humanos es de distribución cosmopolita y continúa causando morbilidad en todo el mundo. Si bien se desconoce su incidencia real, se sabe que puede ser hasta 26 veces mayor que la reportada oficialmente (Mandell *et al.*, 1995; Sauret y Vilissova, 2002; Sbriglio *et al.*, 2007).

Es una enfermedad infecto-contagiosa, que puede ser aguda o crónica, causada por bacterias del género *Brucella*. Con frecuencia, cada especie del género está asociada con determinados huéspedes: *B. abortus* tiene como huéspedes preferenciales el ganado bovino, visón y búfalo. *B. melitensis* es la especie más importante en ovejas y cabras, pero *B. ovís* también puede causar infertilidad

en los carneros. *B. canis* causa enfermedad casi exclusivamente en perros, *B. neotomae* se encuentra en roedores, *B. suis* se presenta en cerdos. Aunque la mayoría de las especies pueden infectar a animales distintos de sus huéspedes (Acha y Szyfres, 2003; Ergonul *et al.*, 2004; Renteria *et al.*, 2005).

La Brucelosis bovina, producida por *Brucella abortus* es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas, expresadas en la disminución de la productividad en el rebaño bovino, se resumen en una menor producción de terneros por abortos, infertilidad en vaquillas, aumento del lapso interparto, menor producción de leche, alta tasa de reemplazos y pérdidas de peso en canales de carne (Nicoletti, 1994; Rodríguez *et al.*, 2001). Debido a la relevancia de esta enfermedad por afectar tanto la salud animal como la salud pública, se realizan grandes esfuerzos a nivel mundial para lograr su control y prevención, siendo una enfermedad de comunicación obligatoria (OIE, 2004; Herrera-López *et al.*, 2007)

El diagnóstico definitivo y confirmativo se basa en pruebas de laboratorio; considerando como el método más confiable el aislamiento e identificación del microorganismo mediante hemocultivo, este procedimiento es lento (hasta siete semanas), tedioso y poco exitoso, por su contagiosidad; de gran riesgo para la salud de los profesionales encargados del estudio. Por estas razones el examen bacteriológico no siempre es practicable (MacMillan, 1990; Sbriglio *et al.*, 2007).

Actualmente, el esquema de diagnóstico de la brucelosis en México, se basa en pruebas serológicas que determinan la presencia de anticuerpos mediante pruebas de aglutinación (Norma Oficial Mexicana 2003). Las más utilizadas en suero sanguíneo son: Prueba de tarjeta o Rosa de Bengala (RB), que detecta anticuerpos IgG1 e IgM contra cepas lisas de *Brucella*; puede ser realizada como prueba tamiz en bovinos, caprinos y porcinos además de ser un procedimiento cualitativo y rápido. Prueba de precipitación con rivanol (RIV), detecta anticuerpos específicos IgM y otras macroglobulinas contra cepas lisas de *Brucella*, su realización se sugiere para efectos de campaña, en sueros de bovinos que previamente resultaron positivos a la prueba de tarjeta; por lo que se considera una prueba complementaria cuantitativa (Nicoletti, 1994; Norma Oficial Mexicana 2003; Bouza *et al.*, 2005).

Prueba de fijación de complemento (FC), determina títulos de anticuerpos fijadores del complemento contra cepas lisas de *Brucella* spp. Esta prueba sirve como prueba confirmatoria en sueros de bovinos, caprinos, ovinos u otras especies, es la técnica de referencia internacional. La OIE sugiere su uso así como ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) por considerarlas pruebas sensibles y específicas (Norma Oficial Mexicana 2003; OIE, 2004; Bouza *et al.*, 2005).

Las múltiples comparaciones de técnicas inmunoenzimáticas realizadas (MacMillan *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1990 y 1993; Mariño *et al.*, 1990, y Gall *et al.*, 1998) con respecto a las convencionales han demostrado en su mayoría, que su aplicación agilizaría programas de control y erradicación de la infección y garantizaría el comercio internacional, sugiriendo la utilización del ELISA indirecto como prueba tamiz de elevada sensibilidad con respecto a RB y del ELISA competitivo con respecto a la FC como prueba confirmatoria y diferencial del estatus de infección o vacunación de los animales reactores positivos en la prueba indirecta (Nielsen, 1998; OIE, 2004).

Dada la importancia del diagnóstico confiable de esta enfermedad y la reciente aparición de nuevas pruebas diagnósticas aún no validadas en nuestro país, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la eficiencia de una prueba de ELISA indirecto en el diagnóstico de la brucelosis bovina, a partir de muestras de suero, comparándola con los resultados de las pruebas de tarjeta rosa de bengala y rivanol.

## Material y Métodos

Fueron utilizados 50 sueros sanguíneos de hembras de bovinos adultos procedentes del rastro municipal, de las cuales 25 resultaron negativas a la prueba de tarjeta rosa de bengala (RB) (Alton *et al.*, 1975) y (Morgan *et al.*, 1987) y 25 resultaron positivas a las pruebas de RB y rivanol (RIV) (Morilla y Bautista 1986) con diferentes titulaciones (de 1:25 a 1:400), posteriormente todas las muestras se sometieron a la prueba de ELISA indirecto (ELISA-I).

En el muestreo se extrajo sangre sin anticoagulante para la obtención de suero. Para su extracción se utilizó un sistema comercial de tubos con vacío y agujas descartables que aseguraron la esterilidad de las muestras tomadas que fueron mantenidas a una temperatura aproximada de 20°C y tras la formación del coágulo, se procedió a la extracción de los sueros por centrifugación de la sangre a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, después fueron trasvasados a tubos eppendorf y congelados a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Para la prueba de ELISA-I se realizó lo descrito por el fabricante del kit DRG<sup>R</sup> (Brucella IgG Ab ELISA bovine EIA-2497), que utiliza microplacas previamente sensibilizadas con el antígeno inactivado. Se depositaron 100µl de cada suero diluido 1:100 en cada uno de los pocillos de la microplaca por duplicado, así como también controles negativo y positivo, el control positivo se utilizó a diferentes concentraciones: 1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480 y 1:960. Posteriormente las muestras fueron incubadas por 60 minutos a 37°C. Luego de la fase de lavado, se depositaron 100µl del conjugado monoclonal Anti-IgG peroxidasa bovino diluido 1:100 en cada uno de los pocillos se incubó por 1

hora a 37°C. Posteriormente del segundo lavado, se agregaron 100µl del cromógeno y a los 15 minutos 50µl de la solución de paro, todos los reactivos fueron proporcionados por el kit. Los resultados fueron leídos en un lector de microplacas (Biorad modelo 680) a 450nm (nanómetros). Las densidades ópticas (DO) de las muestras problemas por duplicado fueron promediadas y corregidas por sustracción de la DO del blanco. Los resultados de las DO de las muestras problema, fueron utilizados de dos formas: Cualitativamente; considerando una muestra negativa si su DO es inferior 2X a la DO del control negativo, una muestra entre 2X y 3X de la DO del control negativo se considero como positivo débil y una muestra superior a 3X de la DO del control negativo se considero como positiva. Cuantitativamente, transformando las unidades ELISA en unidades de aglutinación (IU). El valor de las muestras se calculó comparando su DO con los valores de las DO del control positivo a diferentes concentraciones, considerándose los valores inferiores a 12.5 IU como negativos y los valores arriba de 32 IU como positivos. Valores entre 12.5 y 32 IU se consideran como dudosos.

**Tabla 1.** NIVELES USADOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS SEROLÓGICAS EMPLEADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE *BRUCELLA ABORTUS*

Pruebas	Negativo	Positivo débil	Positivos
RB	No reacción	Reacción	Reacción
RIV	No reacción	Dilución ≤ 1:25 (no vacunados)	Dilución ≥ 1:50 (vacunados)
ELISA-I Cualitativo	< 2X de la DO control negativo	Entre 2X y 3X de la DO del control negativo	> 3X de la DO del control negativo
ELISA-I Cuantitativo	Menor de 12.5 IU		Mayor a 32 IU

DO= Densidad óptica

UI = Unidades Internacionales

RB= Tarjeta rosa de bengala

RIV= prueba de Rivanol

ELISA-I =Enzime Linked Immunoabsorbent Assay Indirect

La ecuación con la que se calcularon las unidades de aglutinación fue el exponencial de la DO de cada muestra menos el intercepto de la curva entre el factor exponencial de ajuste. En la construcción de la curva se estableció la ecuación:  $Y = 0.4687 \ln(x) + 0,095$  ( $R^2 = 0.96$ ). Para analizar las diferencias entre los resultados positivos o negativos de las pruebas serológicas evaluados (RB, RIV, ELISA) se uso la prueba de  $X^2$ , se consideró significativo un valor de ( $P < 0.05$ ). Se utilizó el "software" SAS, 2002. Se estableció la sensibilidad y especificidad para RB y RIV con respecto a ELISA-I, considerando a ésta última

como la prueba confiable (D'Pool *et al.*, 2004; Samartino *et al.*, 2007). La concordancia entre pruebas se calculó mediante la fórmula para el análisis *kappa* (López de Ullibarri, 1999). Se utilizaron las medidas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar) para conocer su ubicación dentro de un conjunto de datos.

La base para la interpretación de cada prueba se muestra en el cuadro 1. Para las pruebas RB y RIV, se utilizó el criterio proporcionado en las referencias. Para la prueba de ELISA se tomo del instructivo del kit utilizado (Brucella IgG Ab ELISA bovine EIA-2497).

**Tabla 1.** NIVELES USADOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE PRUEBAS SEROLÓGICAS EMPLEADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE *BRUCELLA ABORTUS*

Pruebas	Negativo	Positivo débil	Positivos
RB	No reacción	Reacción	Reacción
RIV	No reacción	Dilución $\leq 1:25$ (no vacunados)	Dilución $\geq 1:50$ (vacunados)
ELISA-I Cualitativo	< 2X de la DO control negativo	Entre 2X y 3X de la DO del control negativo	> 3X de la DO del control negativo
ELISA-I Cuantitativo	Menor de 12.5 IU		Mayor a 32 IU

DO= Densidad óptica

UI = Unidades Internacionales

RB= Tarjeta rosa de bengala

RIV= prueba de Rivanol

ELISA-I =Enzime Linked Immunoabsorbent Assay Indirect

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación cualitativa. Para el análisis de las diferencias entre los resultados negativos y positivos de las pruebas serológicas RB y ELISA-I cualitativa, no se consideró estadísticamente significativo la comparación entre los resultados de la prueba ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ).

En el cuadro 2, se muestran los resultados de sensibilidad (96%) y especificidad (100%) para la prueba de RB comparados con los de ELISA-I cualitativo, tanto para animales negativos como positivos. De las 25 muestras de suero negativas a la técnica de RB, todas fueron confirmadas como negativas a la técnica de ELISA-I cualitativa. De las 25 muestras de suero positivas a la prueba de RB, una resultó negativa a la prueba de ELISA, variando la sensibilidad de RB en un

4%. Se determinó la concordancia para el ELISA-I y RB el valor de *kappa* fue de 0.96 (óptimo).

**Tabla 2.** SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA ROSA DE BENGALA COMPARADA CON LA PRUEBA DE ELISA CUALITATIVA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *BRUCELLA ABORTUS*

Prueba	Negativa ELISA	Positivo Débil a ELISA	Positivo a ELISA	Sensibilidad	Especificidad
RB NEGATIVO	25				100%
RB POSITIVO	1	1	23	96%	
TOTALES	26	1	23		50

RB = prueba rosa de bengala

ELISA=Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

Paulin *et al.*, (2009) evaluaron cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *B. abortus* en bovinos mostrando una sensibilidad relativa de ELISA con RB de 93% y especificidad relativa del 98%. Aparicio-Bahena *et al.*, (2003) realizó una evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis de *Brucella abortus* cepa 19, observando una similitud en resultados para sensibilidad 96.8%. Abalos *et al.*, (1998) Utilizaron un ELISA para el diagnóstico y estudio epidemiológico de *Brucella abortus* en Chile, calcularon la sensibilidad relativa de RB comparado con ELISA (95.7%), resultado que coinciden con el nuestro, y una especificidad relativa menor de (82.4%), considerando que RB es un análisis muy sensible que da algunos falsos positivos y que se tomaron en cuenta diferentes puntos de corte referidos por la (FAO, 1991) y ajustados según resultados obtenidos.

Dájer *et al.*, (1995a) en un estudio en Yucatán donde compararon cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*, mostraron resultados muy diferentes a los nuestros, sensibilidad y especificidad relativas RB 100% y 38% respectivamente, considerando que fue debido a que utilizaron muestras de animales vacunados, no vacunados y sin historia de vacunación en hatos libres de infección, razón por la cual es difícil compararlos, ya que en Yucatán la vacunación es una práctica muy común y en nuestro estado no, además en este estudio se comparó a RB con la técnica de fijación de complemento (FC), y se tuvo que realizar un ajuste a los valores para que concordaran con los valores de FC ya que sin ello se produjeron algunos falsos positivos en comparación con FC.

Cuando el ELISA fue comparado con RB, Dájer *et al.*, (1998a) determinaron el

valor de  $kappa$  0.95 y Paulin *et al.*, (2009), 0.91 (óptimo).

Puede observarse que la RB es una buena prueba tamiz, con tanto que una o mas pruebas específicas y de sensibilidades relativas elevadas sean utilizadas como confirmatorias (Norma Oficial Mexicana 2003; Bouza *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2005). La RB es una prueba con alta sensibilidad; sin embargo, al momento de diferenciar los animales vacunados de los infectados, su capacidad es mala, lo que se acrecienta en bovinos revacunados (Aparicio-Bahena *et al.*, 2003).

Comparación cuantitativa. Se analizaron las diferencias entre los resultados positivos de las pruebas serológicas RIV y ELISA-I cuantitativa ( $\chi^2$ ,  $P \leq 0.07$ ), donde se consideró que si hay diferencias entre los resultados de las muestras para diferentes técnicas.

Se muestran en el cuadro 3, los resultados para la prueba de RIV comparados con los de ELISA-I cuantitativo, para animales positivos, así como su sensibilidad comparada con ELISA-I.

De las 25 muestras positivas a RB y RIV solo 22 muestras resultaron positivas a la prueba de ELISA y 3 muestras resultaron negativas, sensibilidad (88%). Cabe mencionar que las muestras que resultaron negativas a ELISA presentaron los títulos de dilución más bajos a rivanol (1:25). Se determino la concordancia para el ELISA-I y RIV el valor de  $kappa$  fue de 0.88 (bueno).

**Tabla 3.** SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA RIVANOL COMPARADA CON LA PRUEBA DE ELISA CUANTITATIVA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *BRUCELLA ABORTUS*

Pruebas	Negativo	Positivo	Total	Sensibilidad
RIV positivo	3	22	25	88%

RIV = rivanol

Dájer *et al.*, (1998 b) utilizaron la prueba de ELISA para el diagnóstico de Brucelosis en el ganado compararon la sensibilidad y especificidad de la prueba de RIV con la de ELISA-I dando como resultado una sensibilidad del 86.4% y una especificidad del 99.6%, resultado que es coincidente con los nuestros en sensibilidad, ya que no se obtuvo especificidad, al no comparar los resultados negativos a RIV con ELISA, en otro estudio de Dájer *et al.*, (1995), compararon cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en Yucatán reportaron sensibilidad (86.%) y especificidad (100%) comparando la técnica de RIV con FC.



Abalos *et al.*, (1998) Utilizaron un ELISA y calcularon la sensibilidad relativa de RIV comparado con ELISA (100%) valor muy diferente al nuestro sugiriendo que pudo haber sido debido a que utilizaron muestras de animales vacunados, no vacunados y sin historia de vacunación en hatos libres de infección, razón por la cual es difícil compararlos con los nuestros.

ELISA fue comparado con RIV, Dájer *et al.*, (1998 a) determinaron el valor de *kappa* 0.90.

Cuando en la prueba de RIV los niveles de la muestra presentan una dilución 1:25, la media de las IU (Unidades Internacionales) en la prueba de ELISA es 1.53, considerando según la referencia que la prueba a ELISA es positiva, siempre y cuando presente un valor mayor a 32 IU (cuadro 4).

Las muestras positivas a la prueba de RIV con títulos de dilución mayor de 1:25 presentaron en la prueba de ELISA una media de 368.52 en donde ELISA tiene valores mínimos de 50.23 IU (Cuadro 4).

**Tabla 4. CUANTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONSIDERANDO LA PRUEBA DE RIV COMPARADA CON DE LA PRUEBA DE ELISA**

Prueba	Totales (n=25)				Positivos Débiles (n=3)		Positivos (n=22)	
	MEDIA	DE	MIN	MAX	MEDIA	DE	MEDIA	DE
RIV	Dil1:33 3	140.2 6	Dil1:2 5	Dil1:40 0	MEDIA A Dil1:2 5	-	Dil1:37 5	84.16
ELISA	324.48	209.9 1	0.92	735.41	1.53	0.8 2	368.52	182.8 2

MIN = mínimo

MAX= máximo

DE= desviación estándar

RIV = rivanol (expresada en diluciones)

ELISA=Enzime Linked Immunoabsorbent Assay expresado en IU (Unidades internacionales)

La prueba de RIV ha sido propuesta como una técnica que puede diferenciar entre títulos de anticuerpos por vacunación e infección (Morgan *et al.*, 1987), este parece ser el caso a partir de nuestros resultados por lo que se sugiere que estas muestras positivas a RB y RIV pudieran provenir de vacas vacunadas con cepa 19, lo cual puede dar una reacción positiva a la prueba RB y con títulos muy bajos a RIV, incluso con resultado negativo a la prueba; y por consiguiente negativo a la prueba de ELISA, por lo que se considerarían títulos vacunales. En

nuestro estado, la vacunación no es común por lo que era de esperarse que las muestras positivas a RIV resultaran positivas a ELISA. Sin embargo, cuando la muestra resulta positiva a RIV (1:25), se toma nuevamente y se observa el resultado considerando que si se trata de un animal infectado pudiera presentar títulos bajos a RIV hasta por un año (Aparicio-Bahena *et al.*, 2003; Rivers *et al.*, 2006).

Se ha mencionado que la prueba de RIV es una buena opción para diferenciar vacas vacunadas con dosis reducida; sin embargo, no se refiere la especificidad de la prueba. Otro trabajo sobre la prueba de RIV en becerras notifica una especificidad del 95% a los 210 días posvacunación con dosis clásica de cepa. En el caso de la revacunación, la prueba de RIV fue poco efectiva al diferenciar vacunados, ya que a los 270 días se observó una especificidad del 74%. Esto se debe a que la respuesta secundaria inducida por la segunda vacunación, provoca la producción de anticuerpos de tipo IgG en grandes cantidades, y en cantidades menores IgM. Por esta razón, la prueba de RIV que detecta anticuerpos IgG, similares a los producidos por una infección, puede reaccionar ante los anticuerpos producidos por la revacunación y provocar resultados falsos positivos (Aparicio-Bahena *et al.*, 2003)

Por otro lado, cuando son animales sin vacunar o vacunados con cepa RB51, y se muestran estos resultados puede ser por las siguientes causas: Si los sueros son del mismo hato, se indica que existe la enfermedad, por lo que animales que presentan una reacción positiva a RB y RIV títulos bajos en 1:25, 1:50, o negativos, son considerados sospechosos, por varias cuestiones; o van empezando la enfermedad o simplemente están en contacto con animales infectados y están montando una respuesta secundaria por estar en contacto con la bacteria, y de ahí que den negativos a la prueba de ELISA (Rivers *et al.*, 2006).

Se sugiere que sería necesario un segundo muestreo de estos animales sospechosos y en un periodo de 28 días, para poder determinar si están en periodo de incubación de la enfermedad y de ser así, los títulos a RIV aumentarían y por consiguiente la prueba de ELISA resultaría positiva en el próximo muestreo.

En ocasiones, algunos de estos casos vuelven a estar negativos incluso a la prueba de RB, por que simplemente en el momento del muestreo los animales estuvieron en contacto con la bacteria, pero no se llegaron a infectar, de ahí que den negativos a ELISA, pero estos casos son muy pocos y casi siempre son en hatos infectados.

Estos resultados pueden llevar a la retención de animales infectados (falsos negativos) en el hato si estas pruebas fueran usadas en campañas de control

(Paulin *et al.*, 2009; Aparicio-Bahena *et al.*, 2003).

Es importante que cuando hay animales positivos a RIV títulos bajos debe confirmarse con otra prueba confiable como ELISA o FC, pruebas que logran diferenciar anticuerpos vacunales y anticuerpos infecciosos.

## Conclusiones

Cualitativamente comparando RB con ELISA hay una disminución de sensibilidad del 4% en RB y en especificidad ambos son iguales con un 100%, sin diferencias en las proporciones ( $X^2$ ,  $P > 0.05$ ) con óptima concordancia (Kappa).

Cuantitativamente al comparar RIV con ELISA disminuye la sensibilidad al 12% en RIV con diferencias en las proporciones. ( $X^2$ ,  $P < 0.07$ ) con buena concordancia (Kappa).

Niveles bajos en RIV pudieran ser anticuerpos vacunales y que ELISA-I considera animales negativos.

ELISA es una prueba complementaria en animales positivos que puede mejorar su sensibilidad en el diagnóstico de *Brucella abortus*.

## Referencias bibliográficas

- Abalos, P., Pinochet, L., Ibarra, L., Navia F. Use of an indirect enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis and epidemiological studies of *Brucella abortus* in Chile. En: Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America. Proc. of the Final Research Co-ordinated research projects. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. IAEA-TECDOC-1055,1998: 49
- Acha, P.N., Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Bacteriosis y micosis. 3ra ed. OMS. Washington D.C. USA: Publicación Científica y Técnica No. 580, 2003. pp: 28-55.
- Alton G.G., Jones, L.M., Pietz, D.E. *Laboratory techniques in brucellosis*. 2nd edition. Geneva: WHO, Monograph series No. 55, 1975. pp: 3-16.
- Aparicio-Bahena, A., Díaz-Aparicio, E., Hernández-Andrade, L., Pérez-González, R., Alfonseca-Silva, E., Suárez-Güemes, F. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Téc Pecu Méx* 2003; 41 suppl 2: 129-140.
-

- Bouza, E., Sánchez-Carrillo, C., Hernangomez, S., González, M.J. Laboratory-acquired brucellosis: A Spanish national survey. *J.Hosp Infect* 2005; 61:80-83
- Dájer-Abimerhi, A., Gutiérrez-Ruiz, E. J., Zapata-Villalobos, D., Honhold, N., Villegas-Pérez, S. L. Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán, México. *Rev Biomed* 1995; 6:84-90.
- Dájer, A., Gutiérrez, E., Zapata, D. Use of Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of brucellosis in cattle in Yucatan, Mexico. In: *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. Proc. of the Final Research Co-ordination Meeting of FAO/IAEA/SIDA co-ordinated research projects. FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. IAEA-TECDOC-1055, 1998:55-59.
- Dájer, A., Gutiérrez, E., Zapata, D. Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucellosis bovina en Yucatán México. *Vet Mex.*1998; 29 suppl 2:167-171.
- D'Pool, G., Rivera, P.S., Torres, T., Pérez, M., García, A., Castejón, O. Prevalencia de brucellosis bovina mediante ELISA competitivo en el municipio la cañada de urdaneta, estado Zulia, Venezuela *Revista Científica*, 2004; XIV suppl 2:168-176
- Ergonul, O., Celikbas, A., Tezeren, D., Guvener, E., Dokuzoguz, B. Analysis of risk factors for laboratory-acquired brucella infections. *J Hosp Infect* 2004; 56: 223-227
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Manual for the Recognition of Exotic Diseases of Livestock, A Reference Guide for Animal Health Staff. Brucellosis ELISA kit manual. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency, Austria [serie de internet] 1991 [consultado 2011 marzo 20] Disponible en: <http://www.spc.int/rahs/>
- Gall, D., Colling, A., Mariño, O.C., Moreno, E., Nielsen, K., Peraza, C. Enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis: Trial in Latin America. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1998; 5 suppl 5:654-661
- Herrera-López, E., Hernández-Andrade, L., Palomares-Reséndiz, G., Díaz-Aparicio, E. Study of brucellosis incidence in a bovine dairy farm infected with *Brucella abortus*, where cattle was revaccinated with RB51. *International Journal of Dairy Science*. 2007; 2suppl1:50-57.
- López de Ullibarri, G.I., Pita, F.S. Medidas de concordancia: *el índice de Kappa Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística*. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña España [serie de internet] 1999 [consultado 2011 marzo 29] 6: 169-171. Disponible en:

<http://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa2.pdf>

- Macmillan, A. Conventional serological test. Chapter 8. En: *Animal Brucellosis*. Ed. Nielsen, K. and R. Duncan, CRC Press. 1990. pp:153-198.
- Mandell, G. J., Bennet, R. D. *Principles and practice of infectious diseases*. 4th ed. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA. Meador V, B Deyoe. 1995; 2:2053-2057
- Mariño, O.C., Gallego, M.I., Sedano, L., Almanza, J.E. Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. Revista ACOVEZ. 1990;14 suppl 1:27-32
- Morgan, B.W.J., MacKinnon, D.J., Gill, K.P.W., Gower, S.G.M., Norris, P.I.W. Brucellosis diagnosis: *standard laboratory techniques*. London: MAFF/ HMSO, 1987:5-30.
- Morilla, G.A., Bautista, C.R. *Manual de inmunología*. México: Diana, 1986. pp:193-223
- Nicoletti, P. 1994. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. *Bovis* 57:17-25.
- Nielsen, K. Brucellosis: Development and success using ELISAs for diagnosis. In: *Toward livestock diseases diagnosis and control in the 21st century*. IAEA/FAO STI/PUB/1023. 1998:35-45.
- Norma Oficial Mexicana Nom-056-Zoo- 1995, *Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria SAGARPA*. [serie de internet] 2003 [consultado 2011 marzo 22] Disponible en: [http://www.qro.sagarpa.gob.mx/Normas\\_oficiales/Catalogo\\_de\\_normas/](http://www.qro.sagarpa.gob.mx/Normas_oficiales/Catalogo_de_normas/)
- OIE. World Organization for Animal Health. *Manual of diagnostic tests and vaccines*. Bovine brucellosis. Paris [serie de internet] 2004 [consultado 2011 marzo 22]. Disponible en: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00052.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00052.htm)
- Paulin, L.M.S., Andrade-Pacheco, W.A., Castro, V., Federsoni, I.S.P. Evaluación entre cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *brucella abortus* en bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 2009;76, suppl 1:9-15.
- Rentería, E.T.B., Organes de los Santos, H., Licea, N.F.A., Medina, B.G.E., Nielsen, K., Montaña, G.M.F. Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Tec Pecu Méx* 2005;43 suppl 1:117-126.
- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., Oñate, A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. Med. Vet.* 2006;38 suppl 1:7-18

- Rodríguez, A., Orduña, A., Ariza, X., Moriyon, I., Díaz, R., Blasco, J. *Manual de Brucelosis*. Ed. Junta de Castilla y León. Copyright. Zamora, España. 2001. pp:139.
- Samartino, L., Schust, M., Piazza, E., Salustio, E., Conde, S. Diagnóstico de la brucelosis animal: implementación de nuevas tecnologías XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2007;15 suppl 1:19-22
- Sauret, J., Vilissova, N. Human Brucellosis. *J. Am Board Fam Pract.* 2002;15:401-406.
- Sbriglio, J.L., Sbriglio, H., Sainz, S. Brucelosis. Una patología generalmente subdiagnosticada en Humanos y que impacta negativamente en la producción pecuaria y desarrollo de nuestros países. *Revista Bioanálisis*. 2007;18-22.
- Wright, P.F., Nielsen, K.H., Kelly, W. Primary binding assay techniques for the serodiagnosis of bovine brucellosis: *Enzyme immunoassay in animal brucellosis*. Ed. Nielsen, K.H., Duncan, J.R. CRC Press, Boca Raton, Florida 1990. pp:199-235.
- Wright, P.F., Nilsson, E., Van-Rooil, E.M.A., Jeego, M.H. Standardisation and validation of enzymelinked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1993;12:435-450.
- Yildiz, F., Tanyel, E., Hatipoglu, C.A., Ertem, G.T., Tülek, N., Oral, B. Evaluation of *Brucella* tube agglutination test in patients with brucellosis, patients with bacterial infections other than brucellosis and healthy subjects. *Mikrobiyol Bul* 2005;39: 211-217.