
UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS FLUORESCENCIA POLARIZADA Y DEL INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO DE COMPETENCIA PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN CABALLOS PURASANGRE DE CARRERAS

Alfredo Sánchez-Villalobos, Mardon Rodríguez-Vargas, Luis Becerra-Ramírez y Robert Cordero

RESUMEN

Se estudió la ocurrencia de brucelosis en sueros de caballos purasangre de carreras mediante las pruebas de fluorescencia polarizada y de ELISA competitiva con el propósito de conocer la utilidad de estas técnicas de detección de anticuerpos y compararlas con los resultados de las pruebas rosa de bengala y antígeno tamponado en placa. Para ello se analizaron 82 sueros provenientes de un criadero del municipio Miranda del estado Zulia, Venezuela, sin antecedentes clínicos, reproductivos ni serológicos de la proble-

mática. En base a un análisis integral de la situación del rebaño se demostró la negatividad a la enfermedad. Ante ese resultado, se procedió a la determinación de un umbral diagnóstico adaptado a las condiciones de la región. Estas proyecciones indican que resultados superiores a 85,3 unidades de milipolarización para fluorescencia polarizada e inhibición >26,3% para ELISA-c son sugestivos de enfermedad en esta especie. Se cuestiona la utilidad de las pruebas de aglutinación.

USE OF POLARIZED FLUORESCENCE ASSAY AND COMPETITIVE ELISA TEST FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN THOROUGHBRED RACING HORSES

Alfredo Sánchez-Villalobos, Mardon Rodríguez-Vargas, Luis Becerra-Ramírez and Robert Cordero

SUMMARY

The occurrence of brucellosis in thoroughbred racing horses was studied using the fluorescence polarization assay and competitive ELISA test, in order to determine the value of these techniques for the detection of antibodies in blood serum and to compare them with the bengal rose and buffered plate antigen tests. A total of 82 sera of from a husbandry in the municipality of Miranda, Zulia state, Venezuela, without any clinical, serological or reproductive disease signs were analyzed. Based on

an analysis of the status of the herd, negativity to the disease was proven. Given this result, the determination of a diagnostic threshold adapted to the conditions of the region was carried out. The results indicate that more than 85.3 milipolarization units for fluorescence polarization and >26.3% inhibition for ELISA-c are suggestive of disease in this species. The usefulness of the agglutination tests is questioned.

Introducción

La infección por *Brucella* en los equinos (*Equus caballus*) suele pasar desapercibida al mantener una condición latente y/o subclínica (Acosta-González *et al.*, 2006) que solo se manifiesta bajo condiciones particulares, aún no precisadas (Cuello *et al.*, 1983; Mcgiven *et al.*, 2003). En tales casos pueden evidenciarse variadas formas, inclu-

yendo enfermedad generalizada, osteoartritis, osteomielitis, tenosinovitis, bursitis, infertilidad en machos, nacimiento de potros débiles de bajo peso e incluso abortos (Collins *et al.*, 1971; Mcgiven *et al.*, 2003). La lesión más característica se describe como una bursitis supraespinosa que cursa con ulceración y presencia de material purulento (Collins *et al.*, 1971). A diferencia de otras especies, el aborto no es una

condición frecuente (Hinton *et al.*, 1977), posiblemente debido a los bajos niveles de eritritol en placenta y líquidos fetales de las yeguas.

Tampoco está bien definido el papel que desempeñan estos animales dentro de la epizootiología de la enfermedad (Milk, 1974; Omer *et al.*, 2000). Algunos investigadores advierten de su rol como reservorio de *B. abortus* y *B. suis* (Lord *et al.*, 1986; Sam-

per y Tibary, 2006) y detallan su importancia en la propagación de la enfermedad a otras especies, incluyendo al hombre (Cuello *et al.*, 1983; Lord *et al.*, 1986), mientras otros, si bien reconocen que la posibilidad de transmisión existe, refieren una mayor resistencia en los caballos, señalando que no se conoce de casos de transmisión de un equino a otro y que la seropositividad en esta especie responde solo

PALABRAS CLAVE / Brucelosis / Equinos / Fluorescencia Polarizada / Inmunoensayo Enzimático de Competencia / Purasangre de Carreras /

Recibido: 11/04/2009. Modificado: 14/01/2010. Aceptado: 15/01/2010.

Alfredo J. Sánchez-Villalobos. Médico Veterinario, La Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Maestría en Docencia para educación superior, Universidad Experimental Rafael M. Baralt (UNERMB), Ve-

nezuela. Profesor, LUZ, Venezuela. Dirección: Policlínica Veterinaria Universitaria. Apartado 15252, Maracaibo, LUZ, Venezuela. e-mail: saucow33@gmail.com

Mardon Rodríguez-Vargas. Médico Veterinario, LUZ, Venezuela. Maestría en Docencia para Educación Superior, UNERMB, Venezuela. Profesor, LUZ, Venezuela.

Luis A. Becerra-Ramírez. Médico Veterinario, LUZ, Venezuela. Residente, Policlínica Veterinaria Universitaria, LUZ, Venezuela.
Robert Cordero. Médico Veterinario, LUZ, Venezuela. Ejercicio privado.

UTILIDADE DAS TÉCNICAS FLUORESCÊNCIA POLARIZADA E DO INMUNOENSAIO ENZIMÁTICO DE COMPETÊNCIA PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EM CAVALOS PURASANGUE DE CARRERAS

Alfredo Sánchez-Villalobos, Mardon Rodríguez-Vargas, Luis Becerra-Ramírez e Robert Cordero

RESUMO

Estudou-se a ocorrência de brucelosis em soros de cavalos purasangue de corridas mediante as provas de fluorescência polarizada e de ELISA competitiva com o propósito de conhecer a utilidade destas técnicas de detecção de anticorpos e compará-las com os resultados das provas rosa de bengala e antígeno tamponado em placa. Para isto foram analisados 82 soros provenientes de um criadouro do município Miranda do estado Zulia, Venezuela, sem antecedentes clínicos, reprodutivos nem serológicos da

problemática. Com base em uma análise integral da situação do rebanho foi demonstrada a negatividade à enfermidade. Diante desse resultado, se procedeu à determinação de um umbral diagnóstico adaptado às condições da região. Estas projeções indicam que resultados superiores a 85,3 unidades de milipolarização para fluorescência polarizada e inibição >26,3% para ELISA-c são sugestivos de enfermidade nesta espécie. Questiona-se a utilidade das provas de aglutinação.

a una alta tasa de enfermedad en los bovinos y porcinos con los cuales coexisten (Cvetnic *et al.*, 2005). En tales casos, la ingestión de material contaminado se describe como la principal vía de infección, sin descartar la penetración por heridas y laceraciones. La ruta usual de transmisión es a través de la contaminación de alimento y agua con excreciones corporales (Collins *et al.*, 1971).

La determinación inequívoca de la infección solo puede realizarse por cultivo e identificación (Collins *et al.*, 1971; Lord *et al.*, 1986; Lucero *et al.*, 2008), pero los inconvenientes concernientes a su implementación, que incluyen dificultades de procesamiento, manejo de cultivos, y muestras que requieran de niveles muy altos de biocontención, además del bajo porcentaje de aislamientos, hace que ese no sea un método útil para un diagnóstico oportuno (Collins *et al.*, 1971; Milk, 1974; Lord *et al.*, 1986; ; Vargas, 2002; Acosta-González *et al.*, 2006; Samper y Tibary, 2006; Lucero *et al.*, 2008). Por tales motivos, el diagnóstico práctico se basa en métodos serológicos. Sin embargo, no existe una prueba única que permita definir cada situación individual o epidemiológica. Ello es especialmente crítico para los equinos, ya que hasta ahora no se ha diseñado ni estandarizado ensayo alguno para el diagnóstico de la brucelosis en esta especie. Los métodos serológicos emplea-

dos para la detección de la enfermedad han sido desarrollados especialmente para su aplicación en bovinos (Vargas, 2002; Mcgiven *et al.*, 2003; Ocholi *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; OIE, 2006), no existiendo criterios claros y uniformes sobre su utilización e interpretación de resultados en equinos.

En Venezuela se ha reseñado (Lord *et al.*, 1986) que el 79,46; 6,33 y 7,26% de sueros de equinos provenientes de fincas y caballerizas con antecedentes de infertilidad, abortos y bursitis supurativas, localizadas en los estados Aragua, Carabobo, Yaracuy, Guárico, Portuguesa, Cojedes y Apure, resultaron con anticuerpos detectables mediante las técnicas de seroaglutinación rápida en placa (SAP), fijación de complemento (FC) y la prueba de rosa de bengala (RB), respectivamente. Estos resultados y el aislamiento de *Brucella abortus* biotipo 1 permitieron a los autores afirmar que la brucelosis equina se encontraba diseminada por todo el territorio nacional (Lord *et al.*, 1986).

En la actualidad, para el diagnóstico de esta enfermedad se encuentran disponibles técnicas de alta precisión, tales como el inmunoensayo enzimático de competencia (ELISA-c) y fluorescencia polarizada (FP), que han sido usadas con éxito en diferentes especies animales y han demostrado alta sensibilidad y especificidad (Nielsen *et al.*,

1998; Mcgiven *et al.*, 2003; D'Pool *et al.*, 2004; Sánchez-Villalobos *et al.*, 2008). Sin embargo, para los équidos y, en especial, para el caballo purasangre de carreras (CPSC), la situación referente a la brucelosis en Venezuela es desconocida y no se cuenta con estándares para la interpretación de resultados de pruebas tradicionales o actuales. Los objetivos de este estudio fueron determinar el valor umbral o de corte para estas técnicas; estudiar su factibilidad en el diagnóstico en la especie y esta raza; y, determinar la ocurrencia de la enfermedad en un criadero del estado Zulia.

Materiales y Métodos

Población y muestra

En Venezuela existen 69 establecimientos dedicados a la cría de CPSC (Superintendencia, 2008). De ellos, siete, con un total de 178 animales, se ubican en el estado Zulia. El presente trabajo se realizó en uno de los más importantes establecimientos de cría de ese estado, ubicado en el municipio Miranda. El manejo de los animales es semi-intensivo, la mayor parte del tiempo en establos individuales. La alimentación se basa en concentrados comerciales y cortas estadías en potreros sembrados con pasto bermuda (*Cynodon dactylon*), recurso forrajero que en época de lluvias es cortado y ofrecido directamente en el establo.

Unidad de análisis

La unidad de análisis primaria consistió en muestras sanguíneas obtenidas a partir de cada uno de los equinos mayores de 6 meses de edad, sumando un total de 82 animales, independientemente de su origen, sexo o estado físico. De cada animal se recolectó 4-6ml de sangre por punción de la vena yugular, para obtención de suero sanguíneo. Dos horas después, las muestras fueron sometidas a centrifugación (Clay Adams, Serofuge 2002, EEUU) a 1500g durante 10min.

Procesamiento

En atención a las recomendaciones de la OIE (2006) que considera a la prueba SAP como inadecuada para el diagnóstico de brucelosis animal a efectos del comercio internacional, y a la señalización respecto a que FP y ELISA-c son similares o superiores a FC, así como que son más fáciles de realizar técnicamente y más consistentes, se decidió a los fines de este estudio, la no inclusión de SAP, ni de FC.

Prueba de rosa de bengala (RB)

La RB se fundamenta en una reacción antígeno-anticuerpo con inhibición de algunas aglutinaciones inespecíficas por acción del pH bajo (Omer *et al.*, 2000; Vargas, 2002; Mcgiven *et al.*, 2003;

Nielsen *et al.*, 2005). Se empleó un antígeno coloreado corpuscular de 8% de concentración celular en una solución tope a pH 3,6 proveniente del laboratorio Pourquier, Francia. La prueba se realizó de acuerdo al formato de la OIE (2006). Las reacciones que presentaron grumos de aglutinación, grandes o pequeños, se consideraron positivos.

Partiendo de dicho antígeno, y siguiendo lo recomendado por Garin-Bastuji *et al.*, 2006, adicionalmente se preparó una dilución en solución salina amortiguada con ácido láctico e hidróxido de sodio al 3% con el cuidado de mantener un pH entre 3,6 y 3,8 y se utilizó bajo el mismo protocolo diagnóstico. Una segunda modificación a la técnica consistió en el simple incremento del volumen de suero a 80µl, respetándose el resto de las especificaciones.

Prueba del antígeno tamponado en placa (BPA)

El antígeno para esta prueba de aglutinación fue provisto por el laboratorio Azul (Argentina), elaborado a partir de la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* en suspensión amortiguada a una concentración celular del 11% y pH ajustado a 3,70 ±0,03. La técnica se ejecutó siguiendo las recomendaciones del manual para animales terrestres de la OIE (2006). Cualquier reacción visible se consideró positiva.

ELISA competitivo

El ELISA-c utilizado (SVA-NOVIR® *Brucella abortus*, Svanova Biotech, Suecia) fue diseñado para detectar anticuerpos específicos contra *Brucella abortus*. Las muestras de suero fueron expuestas a un antígeno lipopolisacárido de la bacteria (S-LPS) unido al fondo de los pocillos de una microplaca de poliestireno, conjuntamente con la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para un epítipo sobre una porción del polisacárido O del S-LPS. Después de la incubación, la microplaca fue lavada y se

agregó un conjugado formado por un anticuerpo contra IgG de ratón obtenido en cabras ligado a una enzima peroxidasa, el cual se une a cualquier anticuerpo monoclonal que se haya fijado al S-LPS de la placa. La aparición de color se debió a la conversión del sustrato por el conjugado y la densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro Elx 800 (Bio-Tek Instruments®, EEUU) a 450nm (OIE, 2006).

La validez de la prueba se estableció según criterios establecidos por el fabricante, los cuales se cumplieron satisfactoriamente. Posteriormente se calcularon los valores de densidad óptica (OD) para los controles y las muestras, que conllevaron al porcentaje de inhibición, PI= 100 - (OD del control o muestra × 100 / OD del control conjugado)

De acuerdo a las instrucciones del fabricante del estuche, todo resultado con PI>30 se consideró positivo. Una vez finalizada la evaluación de los sueros fue posible recalcular un punto de corte adecuado a las condiciones del estudio.

Fluorescencia polarizada

La prueba se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución, siendo el tamaño molecular el principal factor que influencia la velocidad, con una relación de proporcionalidad inversa. Al añadir el suero problema para detectar la presencia de anticuerpos y agregar un antígeno de pequeño peso molecular marcado con un fluorocromo, es posible determinar el tiempo de rotación. La unión con el antígeno marcado provoca un descenso en su velocidad

TABLA I
OCURRENCIA DE BRUCELOSIS EN RELACIÓN A LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS EMPLEADAS

| | RB | RB 3% | RB 80 | BPA | FP | ELISA-c |
|-------------|---------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------------|------------|
| Yeguas | 11/56 (19,6%)b | 1/56 (1,8%)d | 23/56 (41,1)a | 10/56 (5,4)c | 0/56 (0%)d | 0/56 (0%)d |
| Potros | 5/24 (20,8%)b | 2/24 (3,6%)c | 7/24 (29,2%)a | 4/24 (16,7%)b | 0/24 (0%)d | 0/24 (0%)d |
| Sementales | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) |
| Totales | 16/82 (19,5%)b | 3/82 (3,7%)c | 30/82 (36,6%)a | 14/82 (17,1%)b | 0/82 (0%)d | 0/82 (0%)d |
| J de Youden | Agglutinación / Unión primaria= 0,127 | | | | FP / ELISA-c= 0,987 | |

RB: prueba de rosa de bengala, RB 3%: rosa de bengala concentración 3%, RB 80: rosa de bengala con 80µl de suero, BPA: prueba del antígeno tamponado en placa, FP: fluorescencia polarizada, ELISA-c: ensayo inmunoenzimático competitivo. Letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P>0,05).

TABLA II
CÁLCULOS PRELIMINARES DEL PUNTO DE CORTE

| | Promedio | DE | Prom +2(DE) | Prom +3(DE) |
|------------------------|----------|------|-------------|-------------|
| FP (unidades de mP) | 74,28 | 3,67 | 81,6 | 85,3 |
| ELISA-c (% inhibición) | 15,11% | 3,74 | 22,6% | 26,3% |

DE: desviación estándar, Prom: promedio.

rotacional, que puede ser medida ya que una molécula grande emite más luz en un único plano (más polarizada) que una pequeña que gira más deprisa y emite luz menos polarizada (OIE, 2006). Para la prueba se empleó como antígeno un fragmento de bajo peso molecular (media de 22kD) del OPS del sLPS de *B. abortus* (S1119-3) marcado con isotiocianato de fluoresceína proveniente de Diachemix DLL, EEUU.

Para la determinación se diluyó 10µl de cada suero sanguíneo problema en 1ml de solución tampón y se sometió, tras incubación por 5min, a una lectura inicial en un equipo portátil (Sentry 100, Diachemix DLL, EEUU). A esta mezcla se agregaron 10µl del antígeno conjugado con fluoresceína y tras 2min se sometió a una segunda lectura (Nielsen *et al.*, 1998; Mcgiven *et al.*, 2003). El resultado se expresó en unidades de milipolarización (mP). La prueba se consideró válida de acuerdo al criterio de verificación del fabricante, al encontrarse que los sueros controles negativos y positivos bovinos se mantuvieron dentro de los valores estándares.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se organizaron, analizaron y presentaron mediante estadística descriptiva (Argimón-Pallás y

Jiménez-Villas, 2004), lo cual permitió definir de forma precisa las variables estudiadas. Se determinó la proporción de positivos y negativos en cada prueba. Los resultados comparativos entre pruebas fueron estudiados utilizando el programa Win Episcope 2,0 al igual que la determinación de los puntos de corte (*cutoff*) de los ensayos y parámetros estadísticos. El programa se obtuvo de http://infecepi.unizar.es/ratio/soft_sp.htm.

Resultados y Discusión

Los resultados serológicos generales de la investigación se detallan en la Tabla I, donde se aprecia un significativo desacuerdo entre las distintas pruebas diagnósticas. Por un lado se evidencia variación entre la data proveniente de las pruebas de aglutinación respecto a los resultados de los ensayos fundamentados en la unión primaria antígeno-anticuerpo (J de Youden= 0,127). Por otro lado, se muestra inconsistencia entre los hallazgos de las pruebas de aglutinación (BPA, RB y sus modificaciones). Solo los datos provenientes de FP y ELISA-c reflejan congruencia (J de Youden= 0,987).

Pruebas de aglutinación

Al evaluar entre sí los resultados de la aplicación de BPA y RB se determina que

no existen diferencias estadísticas significativa ($P>0,05$) entre ellas, lo que permite afirmar que poseen similar capacidad diagnóstica para el estudio de la brucelosis en los CPSC, aspecto que ha sido señalado también para otras especies (McGivern *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2005; Sánchez-Villalobos *et al.*, 2009). Dado que estas pruebas son consideradas como pruebas tamiz en el estudio de la brucelosis animal, requiriendo ratificación posterior (NORMA, 2003) a través de los métodos confirmatorios descritos por la OIE y aquí empleados, todas las reacciones se clasificaron como falsos positivos.

La variabilidad de los resultados proveniente de las pruebas de aglutinación puede explicarse, entre otras causas, por su escasa especificidad y relativa sensibilidad, que se acompañan de limitados valores de predicción positiva (Nielsen *et al.*, 1998; Vargas, 2002; McGivern *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2005; Sánchez-Villalobos *et al.*, 2009). Ello define que una reacción positiva no necesariamente se corresponde en forma directa con el verdadero estado de enfermedad de los animales. Similares opiniones han sido emitidas por otros autores (Milk, 1974; Lord *et al.*, 1986; Omer *et al.*, 2000; Acosta-González *et al.*, 2006). Esa baja capacidad diagnóstica de las pruebas de aglutinación puede explicar la alta variabilidad encontrada en resultados de estudios dentro de una región, donde por ejemplo se han reportado fluctuaciones que van desde 0,5 a 40% (Cuello *et al.*, 1983). En Venezuela también se ha reseñado (Lord *et al.*, 1986) este hecho, el cual ha pretendido explicarse argumentando corresponsabilidad por el tipo de antígeno, grado de exposición, labor de los caballos y manejo dentro de la explotación, inclusive.

Los falsos positivos también pudiesen deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas que comparten un lipopolisacárido superficial similar al que presenta *Brucella* (Godfroid *et al.*, 2002; Gall *et al.*, 2006). Dentro de

estas bacterias se puede citar a *Escherichia coli* O:116 y O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella* serotipos Kauffman-White del grupo N, *Pseudomonas maltophilia* y *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9. Estas interacciones han sido estudiadas con atención en los bovinos (Mainar-Jaime *et al.*, 2005), por lo que es factible que en el CPSC también sean causa importante de interferencia en el diagnóstico de brucelosis.

Las modificaciones implementadas en relación a la metodología de RB (RB80 y RB3%) produjeron importantes variaciones que deben ser particularizadas. La utilización de 80 μ l de los sueros problemáticos frente a 30 μ l del antígeno (RB80), generó un incremento importante en el número de reacciones inespecíficas, que pudiera conllevar a una sobreestimación de la prevalencia de la enfermedad y conclusiones desacertadas. Es conocido que diversos factores pueden inducir resultados erróneos, tales como la vacunación, edad y presencia de otros gérmenes. En el caso estudiado, dado que no se practica vacunación antibrucela en los equinos, solo la presencia de otras bacterias y/o la edad de los animales pueden considerarse causales de reactividad cruzada (Milk, 1974; Acosta-González *et al.*, 2006).

La implementación de un antígeno experimental preparado a una concentración celular del 3%, produjo un número reducido de falsos positivos, al identificar tres animales reaccionantes, dos de ellos potros. Estos resultados muestran mejor adecuación al estudio serológico de la enfermedad, incluso superior a la prueba original. Similar situación ha sido descrita en caprinos, donde la utilización de la prueba con antígeno al 8% se considera inadecuada (Díaz-Aparicio *et al.*, 1999; Garin-Bastuji *et al.*, 2006). Sin embargo, nuevos estudios son necesarios para llegar a conclusiones válidas en equinos.

En el presente reporte, la variabilidad mostrada respecto a RB y sus opciones proviene única y exclusivamente de las modificaciones implementadas,

sugiriendo que a medida que se incrementa la concentración celular del antígeno o la cantidad de anticuerpos en la prueba, se eleva el número de reacciones inespecíficas, que no corresponden a infección con *Brucella*, ya que no pudieron ser confirmadas por las pruebas con otro tipo de fundamento. Dichas variaciones se corresponden con las condiciones mismas de aplicación de los ensayos y no con la enfermedad.

Ensayos de unión primaria

Los resultados de FP y ELISA-c tuvieron medias y valores próximos a los obtenidos para los controles negativos suministrados por los fabricantes. En el caso de FP, mientras la media de control negativo se estableció en 71,0mP, los sueros de problemas estudiados mostraron un promedio de 74,28 \pm 3,67mP. En dos casos, ambas yeguas madres, la diferencia obtenida entre el promedio del valor negativo y la lectura del suero, arrojó un valor cercano a 10mP. La empresa fabricante del estuche (Diachemix LLC, EEUU) sugiere establecer como límite diagnóstico un diferencial superior a 10mP para la interpretación de los resultados dentro de los EEUU, criterio preliminar que se asumió en este trabajo.

Los datos provenientes del ELISA-c mostraron como valor medio de inhibición (PI) de 15,11 \pm 3,74%, cifras que se correspondieron al valor del control negativo. El máximo valor registrado correspondió a un PI de 21,37%. Si bien, ELISA-c fue diseñado para el estudio de brucelosis en los bovinos, ovinos y caprinos, gracias a su capacidad de discriminar entre animales sanos, vacunados y enfermos (D'Pool *et al.*, 2004; OIE, 2006), no existen razones por las cuales no pueda emplearse en el diagnóstico de equinos u otras especies. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Svanova Biotech AB, Suecia) las muestras con PI \geq 30% se consideran positivas.

En virtud de estos resultados –incuestionablemente negativos–, sumados a la inexisten-

cia de antecedentes (clínicos y serológicos), a los estudios epidemiológicos (carácter infectocontagioso de la enfermedad), manejo de la explotación (no existencia de reservorios, ni co-pastoreo), en concordancia con la normativa vigente en Venezuela (NORMA, 2003) y criterios de la OIE (2006), se concluyó que, para el momento en que se realizó el estudio, no existían animales positivos a brucelosis en el criadero.” Dado los datos epidemiológicos de la explotación, que demuestran que los animales están reducidos a una propiedad cerrada donde no hay co-pastoreo ni se crían otras especies que pudiesen actuar como reservorios de *Brucella* en origen; el carácter infectocontagioso de la enfermedad, y de acuerdo a los criterios de la OIE (2006) y la norma vigente en Venezuela para el control y erradicación de brucelosis (NORMA, 2003), se concluye que, para el momento en que se realizó el estudio, no existían casos positivos de brucelosis en el criadero.

Determinación de los valores umbrales

Para determinar los valores de corte para FP y ELISA-c existen alternativas tales como comparación con una prueba de oro o, en caso contrario, la comparación con otra técnica de alta sensibilidad y especificidad. Dado que las pruebas tradicionales que se utilizan en el diagnóstico de brucelosis, a la luz de experiencias realizadas en Venezuela y otros países no tienen atributos de sensibilidad y especificidad suficientes, no pueden ser consideradas como prueba de oro para la determinación del valor de corte (D'Pool *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; OIE, 2006; Sánchez-Villalobos *et al.*, 2008).

Dado que no se logró demostrar la existencia de animales positivos, fue imposible una separación en frecuencias, por lo que tampoco fue viable utilizar el análisis de las características del operador receptor (análisis ROC) para determinar el valor umbral (cutoff) y describir directamente la sensibilidad y

especificidad de las pruebas diagnósticas comparadas (Jacobson, 1998). Por esto tampoco fue posible calcular valores predictivos, índice Kappa y distribución de frecuencias. En atención a ello se consideró válido proceder al estudio de un umbral diagnóstico adaptado a las condiciones de la región donde se llevó a cabo la investigación. Este punto de corte permitirá inferencias directas sobre el nivel de anticuerpos presentes, diferenciado negatividad de enfermedad, permitiendo la introducción preliminar de estas pruebas diagnósticas en esta especie (Wright *et al.*, 1993).

De acuerdo a estudios de casos con tales características, ese cálculo puede lograrse mediante la sumatoria de cada promedio más dos o tres veces la desviación estándar de dicho cómputo (Wright *et al.*, 1993; Jacobson, 1998). Las proyecciones sugieren que dado el bajo nivel de anticuerpos cuantificables detectados por ambas pruebas, el umbral de separación entre negatividad y enfermedad se encuentra en niveles inferiores a los establecidos para otras especies. Para FP, un valor de corte de apenas 85,3mP, dista bastante de aquel de 94,0 unidades asumido en Argentina como punto de corte fijo en la interpretación de los resultados en los bovinos (Nielsen *et al.*, 1998). En el caso de ELISA-c, la data sugiere considerar infectado a todo CPSC con PI >26,3%. Dado que se trata de un estudio sin precedentes no es posible establecer comparaciones, ni discusiones directas, necesitando nuevas investigaciones al respecto.

Conclusiones y Recomendaciones

El conjunto de CPSC que integraron la población estudiada se consideró negativo a brucelosis, pese a que a las pruebas basadas en mecanismos de aglutinación resultasen con una moderada a alta tasa de reacciones que involucraron desde el 3,7 al 36,6% de los casos estudiados. Estas reacciones se consideraron inespecíficas, al

no poder ser confirmadas mediante la utilización de pruebas confirmatorias de unión primaria. En consecuencia, los resultados permiten proponer como umbral o corte, los valores de 85,3 unidades de mP para el ensayo de FP y un PI de 26,3% para el método de ELISA-c, con lo cual se hace posible la utilización de ambas pruebas en el diagnóstico de brucelosis en esta especie. Caso contrario, bajo las condiciones del estudio, las pruebas RB y BPA resultaron poco confiables para la identificación de la brucelosis equina, razón por la cual no se recomiendan.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados derivan de los trabajos del "Sistema de Vigilancia Epidemiológica para brucelosis del municipio Machiques de Perijá" y han sido posibles gracias al cofinanciado de la Comisión de Desarrollo Científico y Humánico de La Universidad del Zulia (CONDES LUZ).

REFERENCIAS

Acosta-González RI, González-Reyes I, Flores-Gutiérrez GH (2006) Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical region of Mexico. *Can. J. Vet. Res.* 70: 302-304.

Argimón-Pallás JM, Jiménez-Villas J (2004) *Contextos de la Investigación en Ciencias de la Salud. Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica*. 3ª ed. Elsevier. Madrid, España. 404 pp.

Cuello GF, Angiano AB, Uceda AG, Burgos ES, Espejo EJ, Garrido CA (1983) Brucelosis equina. Estudio serológico de algunos casos. *Arch. Zootec.* 32: 160.

Collins JD, Kelly WR, Twomey T, Farrelly BT, Whitty BT (1971) *Brucella*-associated vertebral osteomyelitis in a thoroughbred mare. *Vet. Rec.* 88: 321-326.

Cvetnic Z, Spicic S, Curic S, Jukic B, Lojkić M, Albert D, Thiébaud M, Garin-Bastuji B (2005) Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet. Rec.* 156: 584-585.

Díaz-Aparicio E, Blasco JM, Suárez F (1999) Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Vet. Mex.* 30: 307-311.

D'Pool G, Rivera-Pirela S, Torres T, Pérez M, García A, Castejón O,

Rojas N (2004) Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el municipio La Cañada de Urdaneta estado Zulia Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ* 14: 168-176.

Gall D, Nielsen K, Bermúdez RM, Muñoz Del Real MC, Halbert G, Groulx R, Moreno F, Chow EY, Checkley SL (2006) Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortus equi*. *Res. Vet. Sci.* 81: 215-217.

Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marín C, Albert D (2006) The diagnosis of brucelosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Rum. Res.* 62: 63-70.

Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V (2002) How to substantiate eradication of bovine brucellosis when inespecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veter. Microbiol.* 90: 461-477.

Hinton M, Barker GL, Morgan TL (1977) Abortion in a mare associated with *Brucella abortus* infection and twins. *Vet. Rec.* 101: 526.

Jacobson RH (1998) Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Sci. Tech. Off. Inf. Epiz.* 17: 507-526.

Lord V, Laserna R, Meléndez G (1986) Seroprevalencia de brucelosis en caballos de Venezuela. *Vet. Trop.* 11: 31-42.

Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR (2008) *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.* 136: 496-503.

Mainar-Jaime RC, Muñoz PM, De Miguel MJ, Grillo MJ, Marín CM, Moriyón I, Blasco JM (2005) 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: 913-916.

McGivern JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, Macmillan AP (2003) Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and Ielisa. *J. Immunol. Meth.* 278: 171-178.

Milk ME (1974) Estudio serológico comparativo entre equinos vacunados con *Brucella abortus* cepa 19 y un equino infectado naturalmente con *Brucella abortus*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 86 pp.

Nielsen K, Gall D, Lin M, Massangill C, Samartino L, Pérez B, Coats M, Hennager S, Dajer A, Nicoletti P, Thomas F (1998)

Diagnosis of bovine brucellosis using homogeneous fluorescence polarization assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68: 321-329.

Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Robles C, Bermúdez R, Minas A (2005) Towards single screening tests for brucellosis. *OIE Rev. Scient. Tech.* 24: 1027-1038.

NORMA (2003) *Resolución 127. Normas para el programa de prevención, control y prevención de la brucelosis*. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. [Septiembre 06 pp. 1-7.](#)

Ocholi RA, Bertu WJ, Kwaga JK, Ajogi I, Bale JO, Okpara J (2004) Carpal bursitis associated with *Brucella abortus* in a horse in Nigeria. *Vet. Rec.* 155: 566-567.

Omer MK, Skjerve E, Holstad G, Woldehiwet Z, Macmillan AP (2000) Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. *Epidemiol. Infect.* 125: 447-453.

OIE (2006) *Brucellosis Bovina*. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Organización Mundial de Sanidad Animal. París, Francia. pp. 445-476.

Samper JC, Tibary A (2006) Disease transmission in horses. *Theriogenology* 66: 551-559.

Sánchez-Villalobos A, Pino RD, Becerra RL, Gutiérrez JC, Boscán OJ, García BD, Molero SG (2008) Validación de la prueba fluorescencia polarizada en el diagnóstico de brucelosis y comparación con otras pruebas bajo condiciones naturales de infección en Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ* 17 (Supl. 1): 497-498.

Sánchez-Villalobos A, Villarroel R, Oviedo A, Sandra G, Boscán J, Pinto R, Pirela F, Becerra L, López E (2009) Monitoreo epidemiológico para *Brucella abortus* eb fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela. Parte II: validez y seguridad de las pruebas de anillo de la leche y rosa de bengala. *Rev. Cient. FCV-LUZ* 19: 466-474.

Superintendencia (2008) Registro genealógico de equinos. Superintendencia Nacional de Actividades Hípicas de Venezuela. www.sunahip.gov.ve/ (Cons. 08/04/2009).

Wright PF, Nilsson E, Van roodij M, Letenta M, Jeggo M (1993) Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12: 435-450.

Vargas F (2002) Brucellosis in Venezuela. *Vet. Microbiol.* 90: 39-44.