

Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina (Use of Elisa DAVIH BRU 2 in the diagnosis serológico of the Bovine Brucellosis)

Carmelo Cabrera Pérez MSc*; Eladio Silva Cabrera. Dr. C..Vet; Maricela Izquierdo Márquez. MSc** Consuelo García Montero Dr.C*.**

*Universidad Agraria de la Habana. **Centro de Investigaciones científica de la defensa civil. Cuba

Resumen

Con el objetivo de evaluar el empleo del ELISA DAVIH BRU 2 en el diagnóstico de la brucelosis bovina en Cuba, se estudió su comportamiento en mezclas de suero frente a 872 muestras procedentes de una zona libre de la enfermedad y 14 sueros positivos bien caracterizados. También se analizó su utilidad en el estudio de un foco comparativamente con las pruebas convencionales, para lo cual se emplearon 347 muestras. Se realizó análisis económico comparativo del empleo del ELISA DAVIH BRU 2 utilizando mezclas de sueros y las pruebas convencionales de diagnóstico, teniendo en cuenta la prevalencia. El ELISA mostró una especificidad del 99,65 % al estudiarse en un área libre de brucelosis bovina empleando mezclas de suero y sin que se afectaran la sensibilidad frente a los sueros del panel estudiado. Presentó una concordancia del 100 % con la prueba Rosa de Bengala y ambas técnicas fueron las que detectaron el mayor número de animales reactivos en el estudio del foco de la enfermedad. La combinación del ELISA utilizando mezclas de suero con la Reacción de Fijación del Complemento en el diagnóstico de la enfermedad, resultó el método más económico hasta una prevalencia del 2 %. Los resultados permiten recomendar la introducción del ELISA DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina en Cuba, empleando mezclas de sueros en zonas libres de la enfermedad o con prevalencias hasta el 2 %.

Palabras clave: ELISA, brucelosis, diagnóstico, mezclas.

SUMMARY

With the aim of evaluating the use of the DAVIH BRU 2 ELISA in the diagnosis of bovine brucellosis in Cuba, the behavior of pools of sera against 872 samples from a free zone of the disease, and 14 very well characterized positive sera were studied. The usefulness of this system was also tested in an affected area together with conventional tests, 347 samples were employed. An economic comparative analysis was performed about the use of the DAVIH BRU

2 ELISA, using pools of sera and conventional diagnostics tests, taking into account the prevalence of the disease. The DAVIH BRU 2 ELISA system showed an specificity of 99.65% when it was applied to a free area of bovine brucellosis, using pools of sera, without affecting sensitivity against the sera from the panel under study. It also showed 100% of concordance with the Bengale Rose test. The greatest number of reactor animals were detected by these techniques. The combination of the DAVIH BRU 2 ELISA, using pools of sera, with the

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 1

Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

Complement Fixation Reaction test were the most economic methods, showing a prevalence of 2%. These results make possible to suggest the introduction of the DAVIH BRU 2 ELISA in the serologic

diagnosis of bovine brucellosis in Cuba, using pools of sera, in free zones of the disease, or in areas with a prevalence of up to 2%.

Introducción

La brucelosis es una enfermedad ampliamente estudiada en el mundo, por el peligro que representa para la salud pública (zoonosis), por las pérdidas económicas que ocasiona en la producción pecuaria y por las restricciones que origina en el mercado internacional.

En Cuba existían antecedentes disímiles de la prevalencia de la enfermedad, hasta que en 1962 se realiza una encuesta serológica a más de 100 000 animales, en la que se detectó una seropositividad del 3,2 % (Vera y col., 1999), se decidió entonces por primera vez en 1963 elaborar y poner en práctica el "Plan para el Control y Erradicación de la brucelosis bovina"(IMV, 1967). La lucha contra esta enfermedad es una tarea difícil, en la cual el problema fundamental es el diagnóstico por las dificultades que entraña el aislamiento e identificación del agente causal y por ser un procedimiento lento y costoso, principalmente en el campo de la medicina veterinaria donde se investigan gran cantidad de animales (Izquierdo y Col., 1998). Es por ello que el pesquiasaje se realiza con una batería de pruebas serológicas en las que el resultado aislado de una de ellas no es concluyente debido a su baja especificidad, por esta razón se requiere de pruebas complementarias como la reacción de fijación del complemento (RFC) para confirmar el diagnóstico (NRAG 586., Cotrina y Fernández, 1991).

Como consecuencia del desarrollo científico-técnico de los últimos años, se han incorporado nuevas técnicas en el diagnóstico de la brucelosis (Argote y Rodríguez, 1995; Bercovich y Muskens, 1996; Nielsen y col., 1996^a y b; Lannelli y col., 1998; Pérez y col., 1998; Manzini y col., 1998). Los inmunoensayos del tipo ELISA se aceptaron desde 1994 por la FAO/OIEA/OMS/OIE como una prueba de pesquiasaje para este propósito (OPS, 1994), esta técnica a diferencia de las ya existentes, se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad (Argote y col., 1989; Dajer y col., 1998), por su productividad con bajos costos (Thoen y col., 1995 Reviriego y Cermeño de Giles, 1997; Izquierdo y col., 1998) y su capacidad para diferenciar entre la infección producida por una cepa salvaje y los anticuerpos derivados de la vacunación (Ábalos y col., 1993, Aparicio y vol., 1996).

En nuestro país Argote y col en 1989 y Argote y Rodríguez en 1995 evaluaron el comportamiento del sistema DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, se obtuvieron resultados satisfactorios al comparar los datos derivados de este ensayo con los de las pruebas convencionales empleadas en el diagnóstico de esta enfermedad .

Teniendo en cuenta la baja prevalencia de la enfermedad en nuestro país (Seoane, 2000) y la existencia de estudios anteriores (Vera y col., 1999), nos proponemos en este trabajo evaluar el comportamiento del ELISA DAVIH BRU 2 en el pesquiasaje serológico de la brucelosis bovina en una zona libre, empleando mezclas de suero, y en muestras

individuales en el estudio de un foco. El análisis económico de los resultados nos permitirá elevar el conocimiento sobre este sistema diagnóstico y evaluar la propuesta de su aplicación en el "Plan para el Control y Erradicación de la brucelosis bovina".

Hipótesis de trabajo

La alta sensibilidad y especificidad del ELISA DAVIH BRU 2, permite el empleo de mezclas de sueros en zonas de baja prevalencia reduciendo los costos en el pesquiasaje serológico de la Brucelosis bovina y representa una herramienta certera en el estudio de focos de la enfermedad.

I.1 Objetivos

Objetivo general

Evaluar el empleo del ELISA DAVIOH BRU 2 en el diagnóstico de la brucelosis bovina en Cuba.

Objetivos específicos

1. Evaluar la aplicación del ELISA DAVIH BRU 2 en mezclas de suero en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, en una zona libre de la enfermedad.
2. Analizar el comportamiento del ELISA DAVIH BRU 2 en el estudio de un foco de la enfermedad.
3. Realizar análisis económico- comparativo entre el empleo del ELISA DAVIH BRU 2 utilizando mezclas de suero y las pruebas convencionales de diagnóstico.

II. Revisión bibliográfica

II.1 EPIZOOTIOLOGIA

La brucelosis bovina es generalmente causada por *B. abortus*, menos frecuente por *b. melitensis* y raramente por *b. suis* (OIE, 1994). El reservorio natural de *b. abortus* es el bovino (Boffil y col., 1989)

II.1.1 SUSCEPTIBILIDAD

La patogenicidad del género *Brucella* está relacionada a la producción de lipopolisacáridos que contienen una cadena O de poli N-formil-perosamina, una superoxido-dismutasa de CuZn, la eritrosa fosfato deshidrogenasa, las proteínas inductoras de estrés relacionadas con la sobrevivencia intracelular y el monofosfato de adenina y guanina que inhiben la función fagocítica (Corbel, 1997)

Está demostrada la susceptibilidad de las diferentes especies de mamíferos domésticos:

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 3
Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

Bovinos, porcinos, equinos, ovinos-caprinos, caninos y esporádicamente los búfalo, yak, camello, dromedario, alpaca; entre los silvestres ratas del desierto, liebre, caribú, zorro, hurón, antílope, bisonte americano, visón, etc. (Boffil y col , 1989), además, Bathke en 1981 incluye perro y gato, así como numerosos representantes de los animales salvajes. El aislamiento relativamente reciente de cepas de Brucella de mamíferos marinos ha extendido su rango ecológico (Corbel, 1997).

Se refiere la existencia de una resistencia por la edad que puede demostrarse ya que la enfermedad infecciosa ataca más frecuentemente a adultos y es en ellos más graves que en los animales jóvenes, en los que va aumentando la susceptibilidad hasta alcanzar la madurez sexual (Bathke, 1981).

Especies de Brucella y patogenicidad según el huésped

Huésped	B. abortus	B. suis	B. melitensis
Hombre	+	++	+++
Vaca	+++	+	++
Cerdo	+	+++	+
Cabra	++	-	+++
Cobayo	+++	+++	+++
Conejo	+++	+++	+++

II.1.2 TRANSMISIÓN

Como fuentes de infección se plantean los fetos, envolturas fetales y descargas vaginales que contienen gran número de microorganismos pertenecientes al género Brucellas (Boffil y col 1989), además de las heces fecales, leche y el esperma de los toros. Tienen también un significado trascendental los alimentos de origen animal, productos y subproductos de matadero no procesados correctamente. (Bathke, 1981)

La vía de penetración más importante es el tracto gastrointestinal por ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas (Boffil y 1989), además de la costumbre de las vacas de lamer otros animales y superficies contaminadas (Bathke, 1981)

Cotrina y Fernández en 1991 plantearon que la Brucella penetra al organismo por las membranas mucosas, considerando la conjuntiva como vía más común. En la transmisión mecánica se señalan los perros y animales de rapiña que llevan fetos y envolturas fetales a lugares no afectados, sin dejar de mencionar al hombre.

La transmisión vertical-horizontal se plantea en un 5% y el semen de toros infectados desempeña un papel importante en la transmisión (Cotrina y Fernández, 1991)

A pesar de que la incidencia y prevalencia de la enfermedad alcanzan valores variables y parece no existir relación entre formas de manejo o el tamaño de la explotación (Bathke, 1981), en un estudio realizado en Sri Lanka se muestran como factores de riesgo para B. abortus en búfalos y bovinos, la edad, la zona agroecológica y el sistema de manejo

empleado en las granjas para la seropositividad mediante un ELISA indirecto. Los bovinos mayores de 3 años de edad, mantenidos en una zona seca (precipitaciones anuales 20-25 pulgadas) y criados en un sistema de manejo extensivo presentan las más altas tasas de seropositivos. (Silva y col., 2000)

En Ghana, se realizaron investigaciones que mostraron que no existen diferencias por sexo y razas, sin embargo la edad sí influyó significativamente (Kubuafor y col., 2000)

Según Isloor y col., 1998 una encuesta seroepidemiológica en 23 estados de la India para búfalos y bovinos muestra que no existen diferencias entre las seroprevalencias de ambas especies (1.8 y 1.9% respectivamente) al utilizar la prueba en placa Rosa de Bengala. Respecto al manejo se presentaron diferencias para el ganado bovino entre granjas organizadas y granjeros individuales en el estado sureño Karnataka (4.1 vs 0.7% de seroprevalencia). En granjas organizadas con historia de abortos, retención de placenta y vacas repetidoras la prevalencia fue de 17%.

Brown y Hernandez de Anda en 1998 describen diferencias significativas en diferentes regiones de México con menor seroprevalencia con respecto a los otros, además fueron diferentes significativamente entre la región norte (0.22%), sur-central (3.18%) y el sur costero (9.42 %). En Kenya, Kadohira y col en 1997 encontraron diferencias en la seroprevalencia de la infección entre granjas y zonas geográficas en tres distritos diferentes que se emplearon para un análisis multinivel mostrando que la edad avanzada, el libre pastoreo y el mayor tamaño del rebaño ($>0 = 31$) estaban asociados con las mayores seroprevalencias. Al aumentar el tamaño del rebaño se incrementa significativamente la prevalencia (Kouba, 2000)

II.-1.3 MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN

El objetivo fundamental de la estrategia de control de la brucelosis en el mundo es la prevención de la enfermedad en el hombre y obviamente en los animales. Se basa en el arte de controlar y/o erradicar la enfermedad por lo que se necesita un eficiente diagnóstico, manejo de rebaños, sacrificio de reactores, esquema de profilaxis y bioseguridad capaz de prever su transmisión dentro y fuera de la explotación, así como prácticas de saneamiento (Luna-Martínez y Mejías., 1998). Por razones socio-económicas en algunos territorios las estrategias tienen cobertura regional, nacional o en ciertos tipos de crianza (Alvarez, 1998) e incluso por las características propias de la enfermedad, régimen de explotación y otras condiciones (Bathke, 1981).

La determinación global de la extensión de la enfermedad es la condición más importante para la estrategia de la lucha antibrucelar e internacionalmente se han consagrado los

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 5
Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

siguientes principios que pueden emplearse aislados o más frecuentemente en combinación (Bathke, 1981):

- ✓ Inmunización de animales jóvenes con vacuna viva
- ✓ Recría de terneras libres de brucelosis
- ✓ Eliminación y sacrificios voluntarios
- ✓ Declaración obligatoria y lucha antibrucelar estatales
- ✓ Saneamiento de zonas controlado por el estado

Factores a considerar según Cotrina y Fernández, 1991:

- ✓ Vacunación
- ✓ Saneamiento ambiental
- ✓ Técnicas de manejo
- ✓ Diagnóstico
- ✓ Aprovechamiento de los productos provenientes de hatos o animales infectados
- ✓ Sistema de vigilancia

En la República Checa se erradicó la enfermedad satisfactoriamente en 1964, mediante exploración serológica de todos los animales por pruebas de aglutinación. La campaña se basó primero en la eliminación de los animales infectados y en la última fase rebaños completos donde existieron animales individuales positivos fueron eliminados y reemplazados (Kouba, 2000)

II.1.3.1 METODOS EMPLEADOS PARA EL DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la Brucelosis se realiza mediante la utilización de distintos métodos, los que de acuerdo con las características de la enfermedad, permiten determinar la situación de la misma en el hombre, los animales y en el medio ambiente.

II.1.3.1.1 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

La organización Internacional de Epizotias en 1996 aceptó como pruebas de control para la brucelosis en el intercambio de animales y productos de origen animal entre países:

Especies	Pruebas prescritas*	Pruebas de sustitución**
Bovina	Prueba de Ag Brucela Tamponado (PABT), RFC, ELISA	-
Porcina	PABT	ELISA
Ovina	RFC	ELISA
Ovino-caprina	PABT, RFC	Brucelina

*Se consideran las óptimas para determinar el estado sanitario de un rebaño

** No ofrecen el mismo grado de confiabilidad que las prescritas para la ausencia de infección en los rebaños

En Cuba la RRAG 586 establece como prueba básica la Seroaglutinación Lenta (SAL) y la
Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo.

Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

Rosa de Bengala, como complementaria la prueba de Coombs (PC), Rivanol y el 2

Mercaptoetanol y como confirmatoria la Reacción de Fijación del Complemento. Como ensayo colectivo la prueba de Anillo en leche.

Solamente describiremos los métodos que empleamos en nuestro trabajo.

II. 1.3.1.1.1 SEROAGLUTINACION LENTA EN TUBO. (S.A.L.)

El método de diagnóstico de la Brucelosis más antiguo y difundido es la S.A.L. y se ha mantenido como prueba básica en los programas de control y erradicación de numerosos países no solo por su fácil ejecución que es su ventaja fundamental, sino también por sus resultados uniformes, economía y estandarización a nivel internacional (Argote, 1984). Fensterbank en 1973 expuso que la S.A.L. presenta dos inconvenientes: su falta de sensibilidad que no permite una detección precoz y la dificultad en interpretar los resultados y en particular los títulos aglutinantes bajos. Cotrina y Fernández en 1991, también le confieren baja sensibilidad para detectar animales infectados, el hecho de reaccionar fundamentalmente frente a las IgM hace que se presenten frecuentemente títulos serológicos bajos por su comprobada inespecificidad. Estas desventajas han determinado la necesidad de realizar pruebas diagnósticas complementarias.

Muchos investigadores han reportado el aislamiento de Brucellas en animales con resultados negativos a la S.A.L. en el momento del parto o aborto. (Tablada y Abeledo, 1979).

Las reacciones con títulos bajos a esta prueba en poblaciones libres o con baja incidencia carecen de significación epizootológica. La S.A.L. puede ser negativa en las primeras etapas de la infección y en infecciones crónicas, además no es capaz de diferenciar anticuerpos resultantes de la infección y de la vacunación reciente (Raybould y Chantler, 1980).

García Carrillo en 1982 manifestó que para el diagnóstico serológico es necesario emplear antígenos elaborados en fase lisa del crecimiento microbiano con características aglutinógenas estables deben contener un 0,045% de células suspendidas en solución salina fenolada al 0,5%.

Aunque este método ha sido el más utilizado como procedimiento básico, se han señalado muchas deficiencias en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Fernández en 1982, resaltó la necesidad de emplear pruebas complementarias para evaluar las reacciones que frecuentemente son detectadas en nuestro medio por S.A.L. Las probabilidades de un resultado dudoso a la S.A.L. sea un animal enfermo es directamente proporcional a la incidencia en la población de procedencia.

En los últimos años la prueba se ha modificado por adición al antígeno del ácido tetracético etileno diamínico (EDTA) y otros agentes catiónicos divalentes con el objetivo de reducir el número de reacciones falsas positivas lo que sería conveniente para una erradicación más económica y eficiente de la Brucelosis.

Nowlan y Gues, en 1985; Gues y Nowlan en 1988 recomendaron la modificación para excluir los factores inespecíficos que afectan a la reacción clásica pero MacMillan y Buel en 1985, señalaron que el fenómeno solo se observa en aglutinaciones con títulos muy altos en los animales infectados y raramente este disminuye por la acción de EDTA y nunca por debajo de 100 UI; añadieron que la modificación debe ser usada e interpretada solamente en asociación con la R.F.C.

Atrape y col 1987, plantearon que la Seroaglutinación Lenta en Tubo es efectiva, pero el empleo de la microaglutinación es mucho más eficiente para demostrar la presencia de brucelosis en el ganado bovino.

Cotrina y Fernández en 1991 plantearon que su sensibilidad es menor para detectar animales infectados y que el hecho de reaccionar fundamentalmente frente a IgM hace que se presenten títulos serológicos bajos de escaso valor diagnóstico.

II.1.3.1.1.2 PRUEBA DE ROSA DE BENGALA. (R.B.)

Se trata de una aglutinación en portaobjetos, con antígenos acidificados utilizada como un método rápido de descarte (screening). Es muy sensible, siendo positiva en un 95-99% de los casos, guarda una buena correlación con la Seroaglutinación. (Abarca y Martín, 1995). Según Alton y col 1976, la Rosa de Bengala es en realidad una modificación de la prueba de la tarjeta empleada en E.U.A. y las variaciones en cuanto a su sensibilidad se deben a modificaciones introducidas por diversos laboratorios.

Una de las dificultades que se ha señalado a la prueba es la falta de estandarización internacional del antígeno lo que impide que los resultados obtenidos en diferentes países sean comparables. (Argonte, 1984), además de su extrema sensibilidad en animales vacunados con la Cepa 19 (Cotrina y Fernández, 1991).

Abeledo en 1981, en un estudio comparativo entre la RB y SAL, obtuvo mayor sensibilidad en la primera frente a animales enfermos y una mayor especificidad en población sana, recomendando la misma en la vigilancia epizootológica en territorios libres de la enfermedad. Jacobo en 1985 y Pfeifter en 1986 recomendaron emplearla como método de pesquizaje atribuyéndole una sensibilidad semejante a la conferida por la R.F.C. En algunos sueros los resultados de la R.B. y la R.F.C. son positivos cuando la S.A.L. es negativa o tienen menos de 30 UI/mL.

Varios investigadores han señalado la alta sensibilidad y especificidad de la Rosa de Bengala lo que unido a su fácil manipulación y rápida lectura hacen que la misma sea de gran utilidad en el diagnóstico masivo de la Brucelosis.

De este modo Plommet en 1972 y Priadi en 1992 recomendaron su utilización en el programa de control y erradicación de la Brucelosis por ser simple, fiel y económica.

La RB es muy utilizada para el diagnóstico de la brucelosis porcina pues tiene la ventaja de que en piaras con títulos bajos e inespecíficos a la aglutinación, los resultados son negativos (Rahway, 1993) Se considera uno de los procedimientos más prácticos para el diagnóstico de Brucelosis porcina (Cortina y Fernández, 1991). Samartino y col en 1997, aplicaron la técnica del antígeno buferado en placa (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la Brucelosis y obtuvieron mayor sensibilidad al compararla con la Rosa de Bengala aunque las dos fueron determinante para la condición de animal reaccionante.

II.1.3.1.1.3 REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO. (R.F.C.)

Se reconoce como la técnica más confiable de las empleadas en la rutina para el diagnóstico individual. Es relativamente no reaccionante frente a Ac vacunales con Cepa 19.

Desde la publicación del Tercer Informe del Comité de Expertos en Zoonosis (F.A.O./O.M.S., 1986) se le ha señalado como una de las principales limitaciones, la falta de estandarización internacional del antígeno; posteriormente se recomendó evaluar como positiva una actividad igual o mayor que 1/24 del patrón internacional del suero antibrucella.

Existen dos métodos para la ejecución de esta prueba basados en el 100 y 50% de la hemólisis señalándose que la R.F.C. al 50% es más exacta y ofrece mejores resultados (Abeledo, 1981).

La mayoría de los investigadores coinciden en señalar la sensibilidad de esta prueba sobre todo en aquellos casos en que la S.A.L. se muestra particularmente ineficaz, se recomienda su utilización como método complementario cuando la S.A.L. es usada como prueba básica (Fernández, 1982).

Alonso en 1982, le confirió poca sensibilidad a la R.F.C. comparada con la R.B. y el aislamiento bacteriológico en nuestro país; Argote en 1984, planteó que la R.F.C. muestra poca efectividad como prueba complementaria y no es apropiada como prueba de base, por ser un método más costoso y de menor efectividad para clasificar animales positivos.

Algunos investigadores plantean que la R.F.C. es una prueba ligeramente sensible a las IgM, sin embargo, se ha observado que la IgM es parcialmente inactivada cuando se calienta el suero a 60 °C. (Stryszak, 1986).

Argonte en 1989, señaló que la mayor actividad fijadora del complemento está asociada con los anticuerpos de la clase IgG1 y que por otra parte la IgG2 no es buena fijadora del complemento.

Alonso y col en 1990, compararon la prueba de Aglutinación Rápida en Placa, la RB, Rivanol y la R.F.C. con la técnica de Inmunoensayo en papel de celulosa, demostrando que la mayor sensibilidad y especificidad se obtuvo a favor de esta última prueba; pero muy relacionada con la R.F.C., por lo que sugieren que se use conjuntamente la R.F.C. y la técnica de Inmunoensayo.

Adone y Ciuchini en 1999, evaluaron con una RFC modificada la respuesta inmune contra la cepa RB- 51 y eliminaron previamente la actividad anticomplementaria de los anticuerpos, lo que permitió la diferenciación de los Ac vacunales de los producidos por una infección de campo.

La alta complejidad técnica de la prueba es su principal desventaja (Cortina y Fernández, 1991)

II.1.3.1.1.4 PRUEBA DE INMUNOENSAYO ENZIMATICO. (ELISA)

A finales de la década del 70 comenzaron a realizarse experimentos con la Prueba de ELISA, para aplicarla al diagnóstico de la Brucelosis en varias especies de animales y en el hombre.

En un estudio realizado por Heck y col en 1982 comparando el ELISA con la prueba de la tarjeta, Rivanol, Aglutinación en tubo y RFC en animales vacunados y naturalmente infectados, el ELISA detectó Ac en mas del 93% de animales con bacteriología positiva y menos del 55% con los otros métodos, similarmente fueron detectados ac en 82% de animales con cultivo negativo.

Según los resultados obtenidos por Hornitzky y Cerrazón en 1986 la prueba es un método sensible, específico y económico. Mateo y Martín Castillo en 1993, aplicaron la prueba de ELISA a 177 muestras de suero, con el objetivo de diagnosticar la Brucelosis canina, comparándola con otras pruebas como la R.F.C., 2-ME. y S.A.L. la prueba de ELISA resultó más específica con un 95% de efectividad.

Abarca y Martín en 1995 coinciden en plantear que esta prueba ofrece mayor sensibilidad y especificidad detectando separadamente los anticuerpos IgG e IgM.

Según Gall y col.en 1998 en un ensayo de campo en América Latina con dos ELISA indirectos y 2 competitivos (CELISA) para la detección de anticuerpos a B. abortus mostró que uno de los CELISA se comportó con mas precisión en relación con la RB y la RFC, siendo el porcentaje de reacciones positivas en el CELISA de 97.47% en los seleccionados positivos a la RB y RFC y de 98.32% en los negativos en animales no expuestos y de 96.51% en los vacunados con cepa 19. El mismo ensayo en condiciones canadienses ofrece una sensibilidad de 100% y una especificidad de 99.9% en animales no vacunados, con una especificidad de 97.7% en animales vacunados con cepa 19, lo que demuestra que en algunas circunstancias el CELISA puede diferenciar ganado infectado del vacunado o con microorganismos que tienen reacciones cruzadas.

La Prueba de ELISA es prometedora, sin embargo aún no se encuentra al alcance de los Laboratorios de Diagnóstico Veterinario a nivel provincial en Cuba, situación que ocurre en la gran mayoría de los países del tercer mundo y aún en muchos países desarrollados (Seoane, 2000)

II.1.3.2 DIAGNOSTICO EPIZOOTIOLÓGICO

En el bovino la enfermedad cursa generalmente en tres fases sucesivas: latente, septicemia efímera y abortiva. Las dos primeras fases necesitan medios serológicos para demostrar la infección. En la abortiva, se produce el aborto en la segunda mitad de la gestación (6-8 meses), suele ser espontáneo y generalmente hay retención de placenta. En adultas no grávidas el proceso es fugaz quedando infectadas de por vida. En toros la sintomatología es imprecisa y generalmente se asocia a orquitis y bursitis. En animales jóvenes los gérmenes desaparecen del organismo, lo que explica la rápida evolución de la enfermedad en ellos. Los cambios histológicos más significativos son la necrosis e inflamación del útero y la ubre. En los ganglios linfáticos infectados se puede encontrar hipertrofia reticular e hiperplasia linfoide.

En las alteraciones anatomopatológicas se aprecian cambios muy variables, con predominio de abscesos en los tejidos, especialmente epidídimo y vesícula seminal; también en la mucosa uterina se asientan abscesos miliares. Las envolturas tendinosas y las cápsulas uterinas se afectan igualmente por abscesos. La lesión más constante es la endometritis catarral.

El Instituto de Medicina Veterinaria en 1996, en la nueva edición del Plan de Control y Erradicación de la Brucelosis en los Animales Domésticos expresa que el diagnóstico epizootiológico tiene una gran importancia en la lucha contra esta entidad, ya que permite mediante este análisis, determinar o confirmar la presencia de la enfermedad, aún en aquellos rebaños donde la sintomatología clínica no esté definida, o donde el resultado de las investigaciones del laboratorio no sean las suficientes y exista tendencia al error. Por lo antes expuesto, es necesario que siempre se realice un análisis de la situación epizootiológica del rebaño que se investiga, con el objetivo de poder determinar cuales son los principales eslabones de la cadena epizootica y la forma en que estos influyen para permitir el desarrollo y propagación de la enfermedad.

El análisis del riesgo epizootiológico depende ante todo de la evaluación de las características del proceso epizootico amenazante, de la distancia entre los focos, del grado de exposición de estos y las fuentes próximas a agente etiológico y de sus características, de la posibilidad de contactos directos e indirectos con ellos, del grado de resistencia y susceptibilidad de la población animal, de las medidas contraepizooticas preventivas, etc.(Percedo y col., 1998)

II.2 Inmunología

Conocer la respuesta inmune de los bovinos ante la infección o vacunación con *Brucella abortus* revierte gran importancia para el diagnóstico y vigilancia de la enfermedad. Los isotipos de inmunoglobulinas que intervienen en la respuesta inmune contra *Brucella abortus* son las IgM, IgG1, IgG2 e IgA (Cortina y Fernández, 1991) Algunas de las características más importantes de estas son:

IgM.

- No atraviesa la placenta
- Es termolábil
- Sensible al mercaptoetanol
- Es aglutinante
- Fija el complemento

IgG.

- Atraviesa la placenta
- Termoestable hasta 60 °C
- Resistente al mercaptoetanol
- Fija muy bien el complemento

IgA.

- No atraviesa la placenta
- No fija el complemento
- Abundante en l leche

Existen elementos que diferencian la respuesta de inmunoglobulina en la infección de campo y durante la vacunación, en esta última también existen diferencias, principalmente relacionadas con la edad del animal en el momento de la vacunación. Para tratar sobre los aspectos anteriores nos basaremos en los resultados de Nielsen y col, en 1992, el cual estudió empleando la técnica de ELISA, animales infectados artificialmente con una cepa de B. Abortus y vacunados con cepa 19 (terneros y adultos).

Vacunación de terneros con cepa 19: Se Observó que los primeros anticuerpos en producirse en gran cantidad fueron los del tipo IgM (alrededor del día 5), seguido por los del tipo IgG1, producidos en igual magnitud al día siguiente. De 10 a 15 días después de la vacunación, apareció la respuesta de IgG2 en una magnitud de aproximadamente el 50% de la respuesta de IgG1. La IgG2 fue seguida de una pobre pero sustancial respuesta de IgA en suero. La respuesta de anticuerpos se prolongó con estas características hasta un período de 8 a 10 meses, a partir de este momento no fueron evidentes. Los animales adultos vacunados de la misma forma siguieron el mismo patrón inmunológico, sin embargo, dos aspectos fueron diferentes:

1. La respuesta de anticuerpos fue prolongada, detectándose anticuerpo posterior al año de vacunación.
2. Una parte de los animales permanecieron persistentemente infectado por la cepa vacunal, en estos la respuesta de anticuerpos fue similar a la de aquellos animales con infección de campo.

En los animales que permanecieron crónicamente infectados la respuesta de IgG2 fue considerablemente baja, incluso indetectable en algunos de ellos, mientras que la respuesta de IgM e IgG1 fue de gran magnitud y sostenida. La carencia de anticuerpos IgG2, puede jugar un rol importante en la inhabilidad del animal para eliminar B. Abortus.

Animales infectados experimentalmente: En estos animales la respuesta de IgM e IgG1 comenzó simultáneamente alrededor del día 5, incrementándose hasta alcanzar un máximo a los 15 días, manteniendo niveles elevados durante todo el año de seguimiento experimental. Se observó un declinar en la respuesta de anticuerpos IgM, pero no en la de IgG1. La respuesta de IgG2 e IgA comenzó algo retardada con un pico cercano a los 4 meses después de la infección, manteniéndose en este nivel durante todo el tiempo monitoreado. Ambas respuestas (IgG2 e IgA) resultaron considerablemente inferiores a la de los animales vacunados.

Debido a la relación existente entre reacciones cruzadas asociadas con el isotipo IgM, IgG1 se considera el indicador más apropiado de exposición a B. Abortus.

Relación entre los isotipos presentes en la respuesta inmune contra la Brucella abortus y las principales pruebas serológicas que se emplean en el diagnóstico.

Pruebas serológicas	IgM	IgG1	IgG2	IgA
SAL	X	X		
RFC	X	X		
RB	X	X		
2-Mercaptoetanol		X	X	
ELISA		X	X	
Coombs		X	X	
Rivanol		X	X	
Anillo				X

II. 3. Situación actual de la Brucelosis bovina en nuestro país

Comparación de la focalidad y masa entre los años 1999-2000.

PROVINCIA	FOCOS EN SITUACION			MASA EN FOCOS		
	1999	2000	Dif.	1999	2000	Dif.
P. DEL RIO	16	18	2	38273	29228	(8745)
LA HABANA	1	1	0	14300	14300	0
CIEGO	11	8	(3)	21657	12668	(8989)
CAMAGUEY	67	68	1	49171	38206	(10965)

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo.
Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

TUNAS	56	44	(12)	29706	17593	(12113)
HOLGUIN	2	0	(2)	5649	2169	(3480)
GRAMMA	35	32	(3)	20406	20368	(38)
I. JUVENTUD	4	3	(1)	9222	8030	(1190)
TOTAL	192	174	(18)	188382	144862	(45520)

Dif. Diferencia () disminuye

II. Materiales y Métodos.

III. 1. Muestras y procedencia.

En los estudios realizados se incluyeron muestras de suero de animales procedentes de un área libre de brucelosis perteneciente al Municipio San José de Las Lajas y muestras de suero de animales de un área focal de la enfermedad, ubicada en el Municipio de Consolación del Sur.

El criterio de selección utilizado para cada uno de los estudios fue el siguiente:

- Área libre de brucelosis: Muestras de suero negativas por las pruebas de diagnóstico convencional (SAL y RB).
- Área afectada: Muestras de suero positivas y negativas a la prueba de RB y SAL.

III. 2. Ensayos de Laboratorio.

III. 2 1. Prueba Rosa de Bengala.

Principio de la prueba: Consiste en la detección cualitativa de anticuerpos de tipo aglutinante, presentes en el suero de animales infectados por *Brucella*. Se basa en una reacción antígeno - anticuerpo, en la cual se enfrenta el suero a investigar, a un antígeno de *Brucella abortus* coloreado y a pH ácido.

Procedimiento de la técnica: Sobre una placa de cristal cuadrículada se depositó 0,03 mL de suero y antígeno, posteriormente se mezcló con un agitador de cristal. Finalmente se movió la placa suavemente 6 veces en el mismo sentido, se dejó reposar durante 4 minutos y se procedió a la lectura de los resultados, comenzando por los sueros de referencia positivo y negativo.

III. 2. 2. Seroaglutinación Lenta.

Principio de la prueba: Consiste en la detección semicuantitativa de anticuerpos específicos de tipo aglutinante presentes en el suero de animales infectados por *Brucella*. Se basa en una reacción antígeno - anticuerpo, en la cual se enfrentan diluciones seriadas del suero a investigar, a un antígeno de *Brucella abortus* para aglutinación lenta al 5% en solución salina al 0,85 %, conteniendo fenol al 0,5 %.

Procedimiento de la técnica: Se depositaron en los tubos correspondientes volúmenes de 0,08, 0,04, 0,02 y 0,01 mL de suero a examinar y se le añadieron 2 mL del antígeno diluido, de esta forma quedaron diluciones del suero de 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 respectivamente, posteriormente se agitaron suavemente y se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 horas. Pasado este tiempo, se realizó la lectura sobre una superficie oscura con luz situada detrás de los tubos, por simple observación de la transparencia o aglutinación presente. Cada dilución fue leída de forma independiente como completa, incompleta o negativa, según la NRAG 586.

III. 2. 3. Reacción de Fijación del complemento.

Principio de la prueba: Se basa en la propiedad del complemento de fijarse a los inmunocomplejos, la reacción comprende las siguientes etapas:

- Se enfrentan diluciones del suero con un antígeno de *Brucella abortus* para RFC al 1%, de estar presentes los anticuerpos, reaccionan, formándose los inmunocomplejos.
- El complemento presente en el tubo de reacción se fija al inmunocomplejo (antígeno + anticuerpo) en caso de que éste se haya formado (sistema bacteriolítico).
- Se agrega el sistema hemolítico incompleto (hemolisina + eritrocitos) con el objetivo de evidenciar la reacción antígeno – anticuerpo.
- Finalmente se leen los tubos de acuerdo a la presencia o no de hemólisis.

Procedimiento de la técnica: Con los reactivos preparados de acuerdo a la NRAG 586, se colocaron 3 tubos en una gradilla con las diluciones (1:5 y 1:10) del suero problema y un control de suero (barbital). Se inactivaron a $60 \pm 0,5$ °C en baño de maría durante 30 minutos. Paralelamente se prepararon los controles positivos y negativos, el control de antígeno, de complemento, hemolisina y control de hemolisina e isotonicidad de la solución fisiológica. Se agregó 0,25 mL de antígeno para RFC diluido al 1 % a los tubos que contenían los sueros problemas y controles correspondientes, de igual forma se agregaron 0,5 mL de complemento diluido según la dosis del título. Se incubó a $37 \pm 0,5$ °C en baño de maría durante 30 minutos y se agregó el sistema hemolítico incompleto (eritrocitos al 2 % y hemolisina diluida según título), finalmente se incubó de igual forma antes de realizar la lectura, comenzando por los controles, una primera después de dejar los tubos en reposo durante 10 o 15 minutos y la otra al día siguiente. Para la interpretación de los resultados seguimos estrictamente los criterios expresados en al NRAG 291.

III. 2. 4. ELISA DAVIH BRU 2

Principio de la prueba: Se basa en el principio de un ELISA indirecto y su aplicación incluye las siguientes etapas:

- Los sueros que se han de analizar así como los controles se distribuyen en los pocillos en la dilución indicada, si los anticuerpos están presentes, se unen al antígeno previamente fijado a la fase sólida.

- En una segunda etapa los anticuerpos IgG que reaccionaron con el antígeno, son detectados por una anti-IgG que se encuentra conjugada a peroxidasa (conjugado).
- Se revela la presencia de la enzima inmovilizada en los inmunocomplejos al añadir un sustrato cromogénico, tras la eliminación por lavados de la fracción del conjugado que haya quedado libre.
- Finalmente la reacción se detiene con ácido sulfúrico a una concentración de 2 mole/L y se efectúa la lectura a 492 nm.

Procedimiento de la técnica: La prueba se realizó en muestras de suero, estos se trabajaron diluidos 1: 200 en solución de lavado y se depositaron a razón de 100 μ L por pocillo, incubándose durante 30 minutos a 37 ° C, posteriormente se realizaron 4 ciclos de lavado con un volumen de 300 a 350 μ L de solución de lavado, para luego agregar 100 μ L de la inmunoglobulina anti IgG bovina marcada con peroxidasa e incubar durante 45 minutos a 37 ° C y repetir los cuatro ciclos de lavado. Finalmente se añadió 100 μ L del sustrato cromogénico, se incubó a temperatura del laboratorio (de 20 a 25 °C) durante 15 minutos teniendo el cuidado de proteger la microplaca de la luz. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 mole/L y la lectura se realizó en espectrofotómetro a 492 nm y se realizaron los cálculos según describe el manual de instrucciones del estuche. Las muestras con absorbancia superior al valor límite se consideraron reactivas al sistema por lo que se repitieron por duplicado, considerándose finalmente reactivas aquellas que mantuvieron sus valores de absorbancia igual o mayor que el valor límite en al menos 1 de sus réplicas. Para el cálculo de los resultados se empleó la siguiente fórmula: $VL = 2 (N)$ donde N = media de los valores de los controles negativos.

III. 3. Cálculo de los parámetros de desempeño:

Para evaluar la utilidad del sistema ELISA en la detección de anticuerpos contra Brucella se calculó la sensibilidad, especificidad y concordancia, agrupando los datos en tablas de contingencia 2X2:

Tabla de contingencia 2 x 2 para el cálculo de los indicadores de calidad.

PRUEBA	INDIVIDUOS		
	Infectados	Normales	Total
Positivos	a	b	a + b
Negativos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

Sensibilidad = $a / a + c \times 100$ donde

a = Verdaderos positivos

c = Falsos negativos.

Especificidad = $d / b + d \times 100$

d = Verdaderos negativos.

b = Falsos positivos.

Concordancia = $a + d / n \times 100$

n = Total de muestras en el estudio.

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 16
Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, n° 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

Índice Kappa: El índice kappa (k) es una prueba de concordancia que se basa en la comparación del índice de concordancia esperado (pe) con el índice de concordancia observado (po). Se calculó de la siguiente manera:(OPS; 1994)

$$k = \frac{po - pe}{1 - pe} \quad \text{donde } po = a + d / n$$

Concordancia de los positivos (P) = [(a + b) / n x (a + c) / n] x n

Concordancia de los negativos (N) = (c + d) - { (a + c) - P }

Concordancia en el caso (pe) = (P + N) / n

Los resultados de este índice pueden clasificaron en 5 grupos:

Concordancia	Kappa
Deficiente	< 0,2
Regular	0,21 – 0,4
Moderada	0,41 – 0,6
Buena	0,61 – 0,8
Muy buena	0,81 – 1

III. 4. Análisis estadístico.

Se calculó el coeficiente de variación (CV) para los resultados de los sueros positivos de las tres mezclas, para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$CV = (SD / \text{Media de los Valores}) \times 100, \text{ donde } SD = \text{desviación estándar.}$$

III. 5. Estudios realizados.

III. 5. 1. Evaluación del comportamiento del sistema de ELISA DAVIH BRU 2 en mezclas de suero en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, en una zona libre de la enfermedad.

Muestras: Fueron empleadas 872 muestras de suero bovino de animales procedentes del Municipio San José de las Lajas y 14 sueros positivos a brucelosis bovina con diferentes niveles de reactividad, pertenecientes al panel de sueros del Laboratorio de Control de la Calidad, de Laboratorios DAVIH.

Mezclas de sueros: Las muestras de reactividad desconocida se agruparon en mezclas de 10 sueros en igual proporción.

Se confeccionaron tres mezclas compuestas por 9 sueros negativos cada una. Las muestras de suero positivo del panel fueron diluidas con cada una de estas mezclas en proporción 1:10.

Procedimiento: Todas las mezclas de suero se estudiaron por el sistema de ELISA DAVIH BRU 2, en el caso de las mezclas que resultaron reactivas, se ensayaron los sueros que la componían de forma individual, se consideró una muestra positiva al ELISA cuando resultó

reactiva en al menos dos réplicas. Las muestras positivas al ELISA se confirmaron por RFC. Los resultados se expresaron gráficamente y se analizaron los parámetros de desempeño.

III. 5. 2. Utilización del sistema DAVIH BRU 2 en el estudio de un foco de brucelosis bovina comparativamente con las pruebas convencionales

Muestras: Se estudiaron 347 muestras de suero bovino de animales procedentes de un foco de brucelosis del Municipio Consolación del Sur.

Procedimiento: Todas las muestras se estudiaron por las pruebas de RB, SAL, RFC y por el sistema ELISA DAVIH BRU 2. En todos los casos se siguió las instrucciones para la interpretación de los resultados de la NRAG 291 y del manual de uso del sistema de ELISA. Los resultados se agruparon en tablas de contingencia para el cálculo de los parámetros de desempeño.

III. 5. 3. Análisis económico comparativo del empleo del sistema ELISA DAVIH BRU 2 utilizando mezclas de suero y las pruebas convencionales de diagnóstico

El análisis se enfocó en dos direcciones:

1. Se realizó un análisis matemático para determinar la factibilidad del empleo de mezclas de suero con el ELISA DAVIH BRU 2, teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad, para esto se consideró que solo será factible esta práctica si $MS \leq n$ donde:

MS = Número de determinaciones a realizar en mezclas de suero, para una prevalencia determinada.

$MS = P (n/10) + n/10$

P = prevalencia

n = número de muestras.

2. Se calcularon las fichas de costo de los servicios de diagnóstico serológico de brucelosis bovina empleando el Sistema DAVIH BRU 2 (usando mezclas de suero), RB, SAL y RFC, para el cálculo se tuvo en cuenta los gastos en materias primas, salarios y consumo de electricidad de los equipos de laboratorio empleados en cada técnica. Se tomó como base de cálculo el análisis de 30 000 muestras, teniendo en cuenta NRA 586 y el manual de instrucciones del sistema de ELISA. El análisis de los datos se realizó mediante el empleo de una hoja de cálculos preparada al efecto en Microsoft Excel 2000. En el cálculo de las mismas, no se tuvo en cuenta los gastos comunes que afectarían en igual proporción todos los sistemas y se consideró laboratorios equipados para realizar las diferentes técnicas. Se compararon los resultados del ELISA y las pruebas convencionales según el costo por muestra.

3. se realizó un análisis de sensibilidad según Carpenter en 1992 con relación a la prevalencia, para valorar hasta donde es factible económicamente emplear las mezclas de suero respecto a las pruebas convencionales. El análisis de los datos se efectuó mediante el empleo de una hoja de cálculo en Microsoft Excel del Office 2000, con los datos de la ficha de costo del acápite anterior. Se asumieron prevalencias inferiores al 9 %, sobre la base de 100 muestras.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. 1. Evaluación del comportamiento del sistema de ELISA DAVIH BRU 2 en mezclas de suero en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, en una zona libre de la enfermedad.

De las 872 muestras estudiadas de áreas libres, solo 3 fueron clasificadas como reactivas en el ELISA DAVIH BRU 2, las cuales se confirmaron como negativas en la RFC para una especificidad del 99,65 %.

La figura 1 muestra la relación densidad óptica (DO) vs valor límite (VL) de los 14 sueros positivos estudiados y la media de las DO de las 3 mezclas correspondientes, apreciándose que el sistema DAVIH BRU2 fue capaz de identificar el suero positivo en sus mezclas, independientemente del nivel de reactividad del mismo.

Puede observarse además que las diferencias entre las DO se hace más evidente, en la medida que disminuye la DO del suero estudiado individualmente. Si tenemos en cuenta que la lectura es proporcional al título de anticuerpos presentes, estos resultados son esperados debido a que en una muestra con estas características, el factor de dilución 1: 10 implica que el uso de mezclas afecta más el valor obtenido. Sin embargo, la metodología empleada es sensible para captar estos anticuerpos.

Reviriego y Cemeño de Giles (1997), Izquierdo y col., (1998) manifestaron las ventajas del

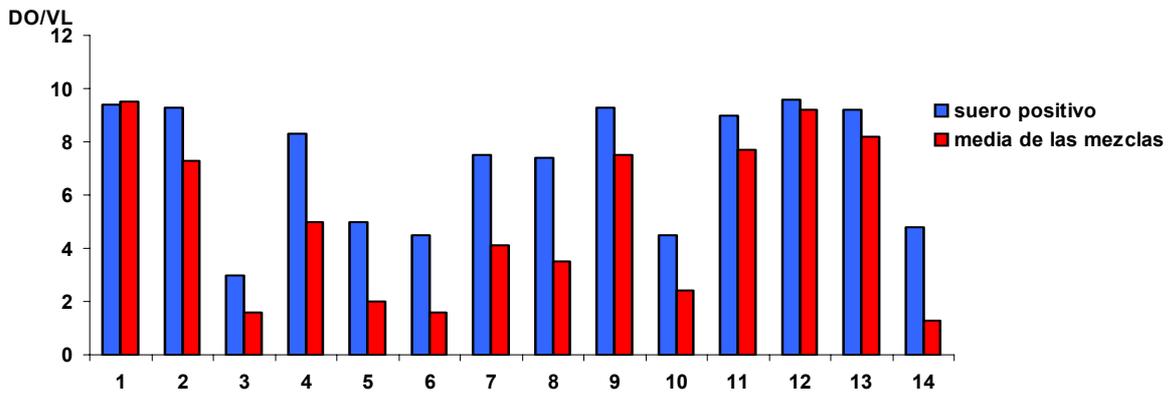


fig 1. Relación de la densidad óptica y el valor límite de los sueros positivos y la media de las mezclas.

empleo mezclas de suero, en campañas de saneamiento en áreas de baja prevalencia de brucelosis bovina, al observar que la sensibilidad y la especificidad de la prueba no se afectaron al estudiar mezclas de hasta 10 sueros. Estos resultados coinciden con los de este trabajo, donde se obtuvo un 99,65 % de especificidad y se identificó correctamente los sueros positivos a *Brucella* en sus tres mezclas e individualmente.

El ELISA con relación a las pruebas convencionales empleadas en la detección de anticuerpos a *Brucella* tiene la ventaja de que tanto los procedimientos para su realización como los reactivos que la conforman son estandarizados, su calidad es controlada, la obtención de sus resultados solo requieren de 2 a 3 horas y el costo por determinación es bajo. Además, esta prueba es capaz de identificar desde el inicio de la infección importantes isotipos (IgG1, IgG2) de inmunoglobulinas específicas, las cuales juegan un importante papel en la respuesta inmune del animal desde etapas tempranas en el curso de la enfermedad. Las IgG1 adquiere niveles significativos en sangre después de transcurrir los primeros 15 días del contagio y mantiene niveles altos hasta la cronicidad, por otra parte, la IgG2 a pesar de presentar niveles bajos en sangre comparativamente con la anterior, tiene importancia durante los últimos meses de la gestación, cuando los niveles del resto de las inmunoglobulinas en sangre disminuye hasta niveles muy bajos (Argote y col., 1998., Nielsen y col. 1992., Díaz, 1998.)

Las pruebas ELISA de tipo indirecto y competitivo son utilizadas con buenos resultados en el ámbito internacional como pruebas serológicas en el pesquizado y confirmación de la brucelosis bovina, algunos países como Canadá ya las tienen incorporadas de forma sistemática en el diagnóstico serológico de esta enfermedad donde forman parte de los programas nacionales de vigilancia (OIE, 1996; Percy du Start y col, 1998).

La figura 2 muestra los resultados de los sueros positivos en las diferentes mezclas, el coeficiente de variación (CV) entre las tres mezclas que contienen un mismo suero positivo, fue en todos los casos inferior al 30 %, sólo las mezclas de un suero presentaron CV superior al 25 %, a pesar de que como se expone en este trabajo, los sueros empleados para la confección de las mezclas fueron diferentes, haciendo de esta forma más significativos estos resultados. Se observó una relación inversa entre el título del suero por ELISA y el valor del CV. Consideramos que los resultados obtenidos demuestran un nivel adecuado de repetibilidad, teniendo en cuenta las características de este experimento. Este aspecto es de gran importancia, pues contrario a lo sucedido en este estudio, es muy probable que un ensayo intrínsecamente variable no pueda responder a los rigores que conlleva un uso sistemático sobre muestras de la población animal que se requiere estudiar (Jacobson en 1998).

Si extrapolamos los resultados de este experimento al trabajo desarrollado en el Laboratorio Provincial de Diagnóstico Veterinario de Provincia La Habana, donde se realizaron 29 661 pruebas de pesquizado y 82 pruebas confirmatorias para el diagnóstico serológico de brucelosis bovina, pertenecientes al municipio San José de las Lajas durante el año 2000 (Cepero, 2000).y tenemos en cuenta que el municipio es libre de brucelosis bovina y que ninguna de las pruebas confirmatorias realizadas resultó positiva, estas muestras se

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 20

podieran analizar por ELISA utilizando mezclas de sueros, de esta forma los resultados se obtendrían en menor período de tiempo, sin afectar de manera significativa el costo y con un margen de sensibilidad y especificidad superior al de las pruebas convencionales. Dicho de otra manera, el número de determinaciones a realizar se reduciría en un 10% y el tiempo de ejecución disminuiría significativamente.

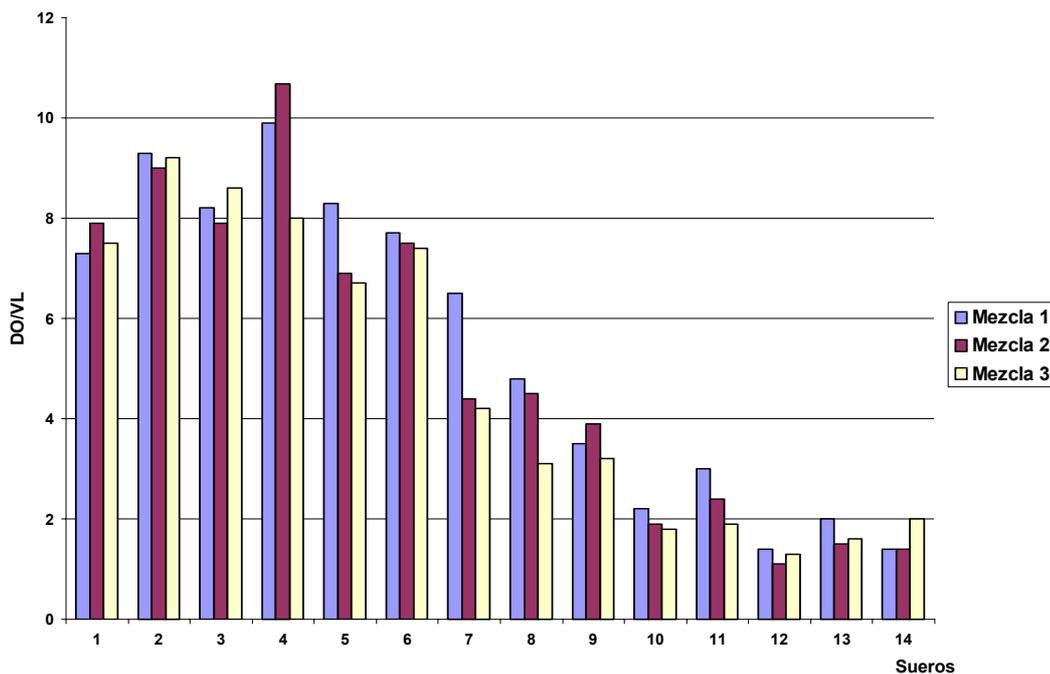


Figura 2. Comportamiento de los sueros positivos estudiados en sus tres mezclas.

IV. 2. Utilización del sistema DAVIH BRU 2 en el estudio de un foco de brucelosis bovina comparativamente con las pruebas convencionales

Varios investigadores han señalado la alta sensibilidad y especificidad de la prueba Rosa de Bengala lo que unido a su fácil manipulación y rápida lectura hacen que la misma sea de gran utilidad en el diagnóstico masivo de la Brucelosis. Es por ello que (Plommet en 1972., Abeledo, 1981 y Priadi en 1992) recomendaron su utilización en el programa de control y erradicación de la Brucelosis.

En la tabla 1 se puede apreciar que los resultados del sistema DAVIH BRU 2 y la RB, en el estudio de muestras de un foco de brucelosis bovina, presentaron valores de concordancia del 100 %, al identificar de igual forma el total de muestras ensayadas. Gall y col, en 1998

encontraron resultados similares al evaluar el ELISA y la RB en poblaciones afectadas de América Latina.

A pesar de esto, se le ha señalado a la RB la falta de estandarización internacional del antígeno, lo que impide que los resultados obtenidos en diferentes países sean comparables. (Argote, 1984), además de su extrema sensibilidad en animales vacunados con la Cepa 19 que la lleva a reportar resultados falsos positivos al estudiar poblaciones con estas características (Cotrina y Fernández, 1991).

Tabla 1. Comparación entre el ELISA DAVIH BRU 2 y la prueba de Rosa Bengala (RB) para la detección de anticuerpos contra Brucella en un foco de brucelosis bovina.

	n = 347	ELISA		
		Positivos	Negativos	Total
RB	Positivos	215	0	215
	Negativos	0	132	132
	Total	215	132	347

C= 100 %
K= 1

Otras de las pruebas utilizadas en el pesquiasaje convencional para el diagnostico de esta enfermedad es la SAL. Cotrina y Fernández en 1991, plantearon que esta técnica presenta dos inconvenientes: su baja sensibilidad que no permite una detección precoz y la dificultad para interpretar los resultados, en particular los sueros que presentan bajos títulos aglutinantes .

El hecho de reaccionar fundamentalmente frente a las inmunoglobulinas del isotipo IgM (aglutinadoras por excelencia) hace que se reporten resultados positivos de bajo título que son realmente falsos positivos de la prueba. En la tabla 2 se muestran los resultados comparativos de esta técnica con el ELISA DAVIH BRU 2.

Tabla 2. Comparación entre el ELISA DAVIH BRU 2 y la prueba de Seroaglutinación Lenta (SAL) para la detección de anticuerpos contra Brucella en un foco de brucelosis bovina.

	n=347	ELISA		
		Positivos	Negativos	Total
SAL	Positivos	204	0	204
	Negativos	11	132	143
	Total	215	132	347

C= 96,82 %
K= 0,93

El ELISA DAVIH BRU 2 detectó en el foco de brucelosis estudiado, un mayor número (11) de animales positivos que la SAL, lo que se pudiera interpretar como una mayor sensibilidad, si tenemos en cuenta los resultados de especificidad de este sistema, expuestos en el
Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 22

Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnostico serologico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

experimento anterior y su concordancia con la RB para esta misma muestra. Resultados similares se describen en los estudios de Argote y col en 1989, Molnar y col, 1998, Samartino y col; 1999, quienes encontraron mayores valores de sensibilidad en las pruebas de ELISA, usadas comparativamente con la SAL en diferentes niveles de prevalencia de la enfermedad.

La elevada sensibilidad de las pruebas de pesquizaje, posibilitan la identificación y saneamiento de los rebaños afectados en menor período de tiempo. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, si asumimos que el ELISA mostró una mayor sensibilidad que la SAL, entonces resultó más eficiente que la misma en el estudio del foco, no solo por la rapidez del diagnóstico, sino también por la calidad de este.

La alta sensibilidad que presentan por lo general las pruebas de pesquisajes hace necesario la utilización de pruebas complementarias más específicas debido a que el aumento de un parámetro va en detrimento del otro. La R.F.C. es la prueba complementaria por excelencia para la confirmación de la presencia de anticuerpos en los estudios serológicos de la brucelosis bovina., sin embargo, la altísima especificidad mostrada por esta técnica puede afectar en ocasiones su sensibilidad si tenemos en cuenta las observaciones realizadas por algunos investigadores que plantean que la RFC es una prueba ligeramente sensible a las IgM, pero esta es parcialmente inactivada cuando se calienta el suero a 60 °C. Stryszak en 1986; Argote y col; 1989 señalaron que la mayor actividad fijadora del complemento está asociada con los anticuerpos de la clase IgG1 y que por otra parte la IgG2 no es buena fijadora del complemento. Estas observaciones se deben considerar al estudiar animales procedentes de una zona afectada por la enfermedad, sobre todo si tenemos en cuenta que un error de sensibilidad de una prueba confirmatoria, puede poner en peligro el éxito del saneamiento del rebaño afectado.

Tabla 3. Comparación entre el ELISA DAVIH BRU 2 y la prueba de Reacción de Fijación del Complemento (RFC) para la detección de anticuerpos contra Brucella en un foco de brucelosis bovina.

	n=347	ELISA		
		Positivos	Negativos	Total
RFC	Positivos	187	0	187
	Negativos	28	132	160
	Total	215	132	347

C= 91,93 %

K = 0,83

Como se puede apreciar en la tabla 3, el sistema DAVIH BRU 2 detectó como positivos 28 animales más que la RFC. Frente a estas muestras, la RFC resultó la prueba que menos animales reactivos identificó, esto puede estar relacionado con lo descrito anteriormente sobre la sensibilidad de esta prueba teniendo en cuenta que el sistema DAVIH BRU 2 presentó valores de especificidad superiores al 99 % en el experimento anterior. Resultados similares con este mismo sistema fueron informados por Argote y Rodríguez en 1995 e Izquierdo y col; 1998. Otros investigadores, (Nielsen y Wright, 1984; OIE, 1996; Percy du Start y col., 1998) señalan que la prueba ELISA posee una sensibilidad similar y en algunos

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 23

Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)®

- Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

casos superior a la RFC, esta última tiene como desventaja la complejidad técnica que exige su ejecución, la constante estandarización de los reactivos que la componen y la práctica necesaria para interpretar sus resultados.

En un estudio realizado por Argote y Rodríguez 1995 empleando el sistema DAVIH BRU2, la SAL y la RFC en el pesquisaje de sueros bovinos pertenecientes a unidades con tres categorías epizootológicas : libre, afectada y vacunada con *Brucella abortus* cepa 19, encontraron que el ELISA fue más sensible que la SAL y la RFC y recomendaron la utilización del DAVIH BRU2 como prueba de pesquisaje. Alonso; 1982; le confirió poca sensibilidad a la R.F.C. comparada con prueba Rosa de Bengala y el aislamiento bacteriológico para nuestro país. Argote; 1984; planteó que la R.F.C. muestra poca efectividad como prueba complementaria y no es apropiada como prueba de base, por ser un método más costoso y de menor efectividad para clasificar animales positivos.

IV. 3. Análisis económico comparativo del empleo del ELISA DAVIH BRU 2 utilizando mezclas de suero y las pruebas convencionales de diagnóstico

Con el objetivo de optimizar el manejo y control de los recursos se impone la aplicación de instrumentos financieros en el proceso de administración de la atención veterinaria para la formulación de políticas y elaboración de estrategias específicas (Erb, 1988; Astudillo, 1991; Carpenter, 1992).

Dichos instrumentos permiten establecer las prioridades en la práctica veterinaria, con el fin de solucionar los problemas más relevantes y evaluar diferentes opciones para su control, sin perder de vista su viabilidad económica, para la elección de las alternativas más adecuadas con respecto al empleo de recursos disponibles por el nivel ejecutivo en la toma de decisiones de programas de salud animal (Astudillo, 1991).

IV. 3. 1. Factibilidad del empleo del ELISA DAVIH BRU 2 para el diagnóstico de la brucelosis bovina en mezclas de suero, teniendo en cuenta la prevalencia de la enfermedad.

Si consideramos una prevalencia del 9 % en una población a estudiar de 100 animales:

$$MS = 9 (100/10) + 100/10$$

$$MS = 90 + 10$$

$$MS = 100$$

Por tanto, para prevalencias $\leq 9 \%$, $MS \leq n$

Los resultados del análisis matemático demostraron que prevalencias inferiores o iguales al 9 % no incrementan el número de determinaciones en relación al estudio individual de los sueros. Esta afirmación se hace más evidente si tenemos en cuenta que en la práctica puede ocurrir que el suero de más de un animal enfermo puede coincidir en una mezcla; cada vez que esto suceda, se dejaran de estudiar 10 muestras en el ELISA de forma individual , lo que hace esta práctica aún más atractiva. Estos resultados sugieren la

factibilidad de emplear el ELISA DAIH BRU 2 en mezclas de suero siempre que se cumplan estas condiciones, no obstante, un análisis de costo por determinación debe argumentar esto.

IV. 3. 2. Cálculo de las fichas de costo de los servicios de diagnóstico serológico de brucelosis bovina empleando: el Sistema DAVIH BRU 2 (usando mezclas de suero), RB, SAL y RFC

En la tabla 4 se aprecian los resultados del cálculo de las fichas de costo para un grupo de pruebas que se emplean en el diagnóstico convencional de la brucelosis bovina y el ELISA usando mezclas de suero, teniendo en cuenta tres indicadores económicos.

Tabla 4. Resultados del cálculo de las fichas de costo por muestra, de diferentes servicios de diagnóstico serológico.

Métodos diagnóstico	Indicadores económicos (\$)			
	Materias primas	Recursos humanos	Energía eléctrica	Costo total por muestra
RB	0,0052	0,0708	0,00004	0,076
SAL	0,0032	0,1416	0,0028	0,1476
RFC	0,033	0,2664	0,005	0,3044
ELISA	0,048	0,0262	0,0005	0,0747

El empleo de mezclas de suero resultó un método eficiente desde el punto de vista económico de acuerdo con los indicadores estudiados, solo fue superado en un estrecho margen por la RB. El indicador que determinó estos resultados fue el relacionado con los recursos humanos, al ser el ELISA la técnica que menos horas empleó en el diagnóstico.

El indicador que más afectó el costo de la prueba ELISA fue el de gasto por materia prima, en este sentido debemos tener en cuenta que a los efectos del presente estudio utilizamos el precio para el mercado internacional, su empleo en nuestro país pudiera modificar este indicador.

El elevado grado de laboriosidad de la RFC influyó significativamente en su costo por recursos humanos (el más elevado) y fue determinante en el alto costo por determinación de esta prueba.

En el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina se utilizan convencionalmente, un ensayo de pesquisaje (SAL o RB) y una prueba confirmatoria (RFC). El ELISA se recomienda en la literatura para el pesquisaje, a pesar de que ha mostrado una excelente especificidad y sensibilidad en estudio previos, con valores superiores a la RFC. En consideración se debe analizar como influye los costo y la prevalencia en el empleo de las diferentes combinaciones de pruebas incluyendo el ELISA.

IV. 3.3. Comparación económica del ELISA y los esquemas diagnóstico convencionales para diferentes prevalencias.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del cálculo de costo de los diferentes esquemas diagnósticos para un grupo de pruebas que se emplean en el diagnóstico convencional de la brucelosis bovina y el ELISA usando mezclas de suero, teniendo en cuenta diferentes prevalencias.

Tabla 5. Resultados de la comparación entre el ELISA y las pruebas convencionales, teniendo en cuenta diferentes niveles de prevalencia de la enfermedad y el costo por determinación

Esquema Diagnóstico	Prevalencia %						
	1	2	3	4	5	6	7
A	6.532	12.402	18.272	24.142	30.01	35.882	53.492
B	2.945	5.228	7.511	9.794	12.08	14.36	21.209
C	6.760	12.858	18.957	25.055	31.15	37.251	55.546
D	5.598	5.826	6.054	6.283	6.512	6.739	7.424
E	10.418	10.646	10.875	11.103	11.33	11.559	12.244

A: ELISA (usando mezclas de suero)+ELISA (usando las muestras individuales) **B:** ELISA (usando mezclas de suero)+RFC **C:** ELISA (usando mezclas de suero)+ELISA (usando las muestras individuales) + RFC
D: RB + RFC **E:** SAL + RFC

La combinación del ELISA DAVIH BRU2 utilizando mezclas de suero con la RFC, resultó el método (B) más económico con respecto al resto de las pruebas hasta una prevalencia del 2 %. En prevalencias del 3% o superiores, resultó la RB y la RFC la combinación (D) más rentable desde el punto de vista económico. Estos datos confirman lo antes expuesto, acerca de la conveniencia del uso del ELISA en el pesquiasaje serológico de la brucelosis bovina en zonas libres o de baja prevalencia de la enfermedad como en el municipio donde se desarrolló el trabajo, en el cual según los datos epizootiológicos, no se reportan casos de brucelosis bovina desde hace más de 10 años.

El ELISA como método de diagnóstico en la brucelosis bovina, constituye una herramienta de gran valor en las campañas de control y erradicación de esta enfermedad, al disminuir los costos sin afectar los indicadores de calidad de las pruebas diagnósticas.

V. DISCUSION GENERAL

Desde el inicio del Plan para el control y erradicación de la brucelosis bovina en Cuba en 1963 donde se detectó una seropositividad del 3,2 % (Vera y col., 1999), esta enfermedad ha decrecido paulatinamente y actualmente el 97,18 % de la masa total es libre, su incidencia es de 0,19 % y la prevalencia de 0,6 % (Seoane; 2000). Además las zonas focalizadas están bien caracterizadas por provincias, lo que permite establecer una estrategia diagnóstica diferenciada de acuerdo a la situación epezoootiológica.

A partir de 1965 se estableció en el laboratorio nacional y algunos provinciales o regionales, el empleo de la seroaglutinación lenta como la prueba de base conjuntamente con la Reacción de Fijación del Complemento como confirmatoria. En 1970 con el objetivo de esclarecer casos de interpretación compleja se iniciaron de forma limitada los ensayos con las pruebas 2-Mercaptoetanol (2-ME), Rivanol en placa, prueba de Coombs, Inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.) y Rosa de Bengala (Fernández 1982; Argote, 1989). Desde entonces el diagnóstico se realiza con estas técnicas, a pesar de que hace algunos años en el mundo se incursiona en la búsqueda de nuevas alternativas y que aún persisten focos de la enfermedad en diferentes territorios del país donde se ha hecho difícil erradicar la brucelosis. El empleo de métodos de diagnóstico serológico de alta sensibilidad para la detección de animales reactivos, tiene gran importancia epizootiológica para mantener una profilaxis sistemática y sanear rebaños afectados en el menor tiempo.

La necesidad de emplear técnicas diagnósticas confiables, económicas y de fácil ejecución ha sido un reto en los últimos años (Argote y Rodríguez, 1995; Bercovich y Muskens, 1996; Nielsen y col., 1996^a y b; Lannelli y col., 1998; Perez y col., 1998; Manzini y col., 1998). En este sentido la técnica de ELISA se aceptó desde 1994 por la OIE, como prueba de pesquisaje para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, por su elevada sensibilidad y especificidad (Argote y col., 1989; Dajer y col., 1998) por su productividad a bajos costos (Thoen y col., 1995; Reviriego y Cermeño de Giles, 1997; Izquierdo y col., 1998) , por ser un método estandarizado con calidad controlada (Ortiz y col., 2000) y por diferenciar entre una infección producida por una cepa salvaje y los anticuerpos derivados de la vacunación. (Abalos y col., 1993; Aparicio y col., 1996).

Los resultados de este trabajo demuestran que se puede emplear el ELISA DAVIH BRU 2 utilizando mezclas de suero en el diagnóstico de la brucelosis bovina, sin que se afecte la especificidad ni la sensibilidad de la técnica, coincidiendo con estudios citados anteriormente en este trabajo. También este sistema al igual que la RB fue el que más animales positivos detectó en el estudio del foco de la enfermedad y se demostró matemáticamente que los costos por determinaciones son inferiores al resto de las pruebas en zonas donde la prevalencia es menor o igual al 2%.

La información sobre los indicadores utilizados para la evaluación de los medios diagnóstico cualitativo es reducida. El análisis de parámetros de desempeño como la sensibilidad y especificidad de los medios diagnóstico, se encuentran entre los aspectos más estudiados por muchos investigadores e incluso recomendado por organizaciones internacionales como la Organización Panamericana para la Salud en su manual de procedimientos de control de

calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre (OPS;1994; Argote y López.,1995) Jacobson; 1998, le confiere especial importancia a estos parámetros en la validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

En términos generales la sensibilidad se define como el porcentaje de muestras que contiene el analito conocido y que dan un resultado positivo, en tanto la especificidad como el porcentaje de muestras en las cuales es conocida la ausencia del analito y que dan un resultado negativo en la prueba que se está evaluando (Argote y López.,1995; Jacobson., 1998).

La especificidad mide la capacidad de la prueba para identificar anticuerpos que reconozcan exclusivamente el agente etiológico, y no otros cuya presencia pueda venir inducida por antígenos de otros microorganismos (emparentados o no con el agente en cuestión) provistos de reactividad cruzada (Wright.,1998).

Por todo lo anterior, la técnica serológica ideal para el diagnóstico de cualquier enfermedad es aquella que presenta valores cercanos al 100% de especificidad y sensibilidad. En las pruebas convencionales para el diagnóstico de la brucelosis bovina, no se obtienen estos valores para ambos parámetros debido a las características de sus reactivos y la complejidad de la respuesta inmune de los animales contra la infección y frente a la vacunación. Sin embargo, el ELISA al ser capaz de identificar solamente los anticuerpos específicos de la enfermedad, aún en momentos en que estos se encuentran en niveles bajos en sangre, ha demostrado en reiteradas evaluaciones valores de sensibilidad y especificidad superiores a los obtenidos por las pruebas convencionales.

El ELISA constituye una prueba de gran rapidez por ser su ejecución semiautomatizada, esto permite reducir errores que pueden ocurrir en el trabajo con las pruebas convencionales, generalmente por malas prácticas de laboratorio. Además, los resultados del ELISA concluyen con la lectura de los resultados en un espectrofotómetro (informe cuantificable), sin dejar espacio para la subjetividad de la interpretación del técnico.

Teniendo en cuenta los datos de incidencia de la enfermedad en nuestro país y el análisis de los costos realizados en este trabajo, esta práctica se pudiera emplear para el monitoreo de la sangre en más del 97 % de la masa bovina que incluye zonas libres y áreas de prevalencia menores o iguales al 2%, con esto, el plan nacional para el control y erradicación de la brucelosis bovina, ganaría en eficiencia sin elevar los costo del mismo.

Se conoce que muy pocos laboratorios de la red de diagnóstico veterinario del país cuentan con la tecnología requerida para el trabajo con diagnosticadores basados en el ELISA y que este equipamiento es costoso porque en su mayoría debe ser adquirido en el mercado internacional. Si se tiene en cuenta que el servicio que pudiera brindar un laboratorio con esta tecnología, no solo se limitaría al diagnóstico de la brucelosis bovina, sino también de otras enfermedades infecciosas para las cuales se han estandarizados esta tecnología en Cuba y en el ámbito internacional.

Por todo lo antes expuesto consideramos que sería conveniente emplear el sistema DAVIH BRU 2 en la vigilancia epizootiológica de la brucelosis bovina en Cuba, usando mezclas de suero en aquellas zonas libres de la enfermedad o donde la prevalencia sea inferior o igual al

2%. Su uso sistemático en el estudio de los focos de la enfermedad ayudará a erradicar la misma, al aportar al programa elevados valores de sensibilidad, especificidad así como ventajas técnicas que hacen de esta prueba una herramienta valiosa para estos fines.

VI. CONCLUSIONES

1. El ELISA DAVIH BRU 2 mostró una especificidad del 99,65% al estudiarse un área libre de brucelosis bovina empleando mezclas de suero.
2. El uso de mezclas de suero en el sistema, no afectó la sensibilidad frente a los sueros del panel estudiado.
3. El ELISA presentó una concordancia del 100% con la Prueba RB y ambas técnicas fueron las que detectaron el mayor número de animales reactivos en el estudio del foco de la enfermedad.
4. Se demostró que el empleo de mezclas de suero con el sistema DAVIH BRU 2 no incrementa el número de determinaciones en relación con el estudio individual de los sueros en prevalencias iguales o inferiores al 9%
5. El empleo del ELISA con mezclas de suero en el pesquizado serológico de la brucelosis bovina resultó un método eficiente desde el punto de vista económico, solo fue superado por un estrecho margen por la RB.
6. La combinación del ELISA utilizando mezclas de suero con RF en el diagnóstico de la enfermedad, resultó el método más económico hasta una prevalencia del 2%

VII. RECOMENDACIONES

1. Introducir el ELISA DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina en Cuba.
2. Emplear el sistema con mezclas de suero en zonas libres de la enfermedad o con prevalencias hasta el 2%.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abalos, P.; Pinochet, L. y Fábrega, F. (1993): Desarrollo de una prueba de ELISA para descartar respuestas post-vacunales con cepa 19, utilizando un anticuerpo soluble polisacárido de Brucella abortus. 1119-3. Av. Cienc. Vet. 8(2): 138-143.
2. Abarca, M. ; Martin, J. A. "Diagnóstico y tratamiento de la Brucelosis y Salmonelosis". Manual de Diagnóstico y Terapéutica Médica. Departamento de Medicina Interna. Hospital 12 de Octubre. Universidad Complutense de Madrid. pp. 632-635. 1995.
3. Abeledo, María A. "Prueba de Rosa de Bengala en el Diagnóstico de la Brucelosis bovina en Cuba". Tesis de Candidatura. CENSA. 1981.
4. Adone, R. y Ciuchini, F. (1999): Complement fixation test to assess humoral immunity in cattle and sheep vaccinated with B. Abortus RB 51

5. Alonso, Milagros. "Comportamiento de la Rosa de Bengala frente a otras pruebas serológicas en el diagnóstico de la Brucelosis". Trabajo de Tesis segundo nivel de especialidad. I.M.V. 1982.
6. Alonso, G.; Rojas, X.; Mansilla, H.; Wright, P. y Desuelle, D. "El diagnóstico de la Brucelosis porcina en Chile". Facultad de Medicina Veterinaria, Valdivia. Chile. Archivo de Medicina Veterinaria. 22 (2): 129-133. 1990.
7. Alton, G. ; Jones, M. L. y Pietz, D. E. "Las técnicas de laboratorio en Brucelosis". 2a. Ed. Ginebra, Suiza. 1976.
8. Alvarez, E. (1998). Situación de la Brucelosis en América. Panorama general en Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. SAGAR, UNAM, OPS. Acapulco, Guerrero, México 20-21 de julio.
9. Aparicio, B. A.; Aparicio, E.; Pérez, R.; Hernández, Laura; Velazquez, F.; Alfonseca, E. y Suárez, F. (1996): Serological and bacteriological evaluation in cattle herd with brucellosis, revaccinated with Brucella abortus strain 19 reduce dose. p.40.
10. Argote, Esther y López, Grisel. (1995): Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnóstico basado en la técnica ELISA. Rev. Cub. Cienc. Vet. 24:16-19.
11. Argote, Esther y Rodríguez, Orfelina (1995): Diagnóstico de brucelosis bovina empleando el sistema micro ELISA DAVIH-BRU-2. Rev. Salud Anim. 17: 39-44.
12. Argote, Ester. "Brucelosis bovina; valoración de diferentes pruebas complementarias para el diagnóstico serológico en Cuba". Tesis de Candidatura. CENSA. 1984..
13. Argote, Esther; Rodríguez, Orfelina; Sánchez, Iris y Tabares, Dolores (1989): Aplicación de la técnica ELISA en el diagnóstico de la Brucelosis bovina en Cuba. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 20(2): 181-188.
14. Astudillo, V. M. (1991): Gerencia de programas de salud animal a nivel local. Bol. Of. Panam. Fiebre Aftosa. 41: 15-20.
15. Atrape, D.; Garin, B. y Gaumont, R.(1987): "Slow plate micragglutination tests for the diagnoses of Brucellosis comparison with the standard tube agglutination tests". Bulletin the Information des Laboratoires des Services Veterinaires. Maisons-Alfort. Francia.
16. Bathke, W. : Brucellosis. En " Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos" Joachim Beer. Ed. Acribia. Tomo II. Zaragoza España. Pags 142-156, 1981.
17. Bercovich, Z. and Muskens, J.A.M. (1996): The sensitizing effect of a Brucella abortus antigen in cattle after repeated intradermal inoculations. Vet. Microbiol. 51 (1-2): 85-93.
18. Bercovich, Z.(1998): Maintenance of Brucella abortus-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. : Vet Q. Jul; 20(3): 81-8.
19. Boffil, P.; Rivas, A.; Ramirez, W.; Montañez, J.; Martínez, A.; Quincoses, T.; González, L. R. y Fustes, E. "Manual de Enfermedades Infecciosas". Tomo I. Ed. I.S.A.C.H., M.E.S. 1989.
20. Brown, W.H. y Hernández de Anda, J. (1998): Brucellosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas. J Am Vet Med Assoc. Apr 1;212(7):1000

21. Carpenter, T. (1992): Análisis Costo-Beneficio: Principios básicos. En: Análisis costo-beneficio y toma de decisiones para directores de programas de salud animal. Sem. Regional conjunto. FAO/OPS/OMS. Buenos Aires, Argentina.
22. Cepero, W. (2000): Informe técnico anual. Laboratorio Provincial Diagnóstico Veterinario. San José de las Lajas. La Habana.
23. Corbel, M. J. (1997): Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* . Apr-Jun;3(2): 213-219.
24. Cotrina, N. y Fernández, A. (1991): Brucelosis, problema sanitario y económico. Ed. Científico-técnico, La Habana.
25. Dajer, A.; Gutierrez, E.J. and de las Mercedes, Delfina (1998): Use of an ELISA and the Rivanol agglutination test for the diagnosis of bovine brucellosis in Yucatan state, México. *Veterinaria –México*. 29 (2): 167-171.
26. Díaz, E. (1998): Pruebas de diagnóstico en población animal. Memorias del Foro Nacional de brucelosis. SAGAR.
27. Erb, H. N. (1988): The benefit-cost analysis of disease control programs. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 4 (1): 169-181.
28. F.A.O./O.M.S./O.I.E.(1986) "Sexto Informe del Comité Mixto de Expertos en Brucelosis".
29. Fensterbank, R. "Appreciation de le valeur de la reaction au Rose Bengal sur les serums de genisses experimentalement avec Brucella abortus". XLI Session Generale de Comite de L'Office International des Epizootie. Repport. No.109. 1973.
30. Fernández, A. "Algunos aspectos epizootiológicos de la Brucelosis bovina en las condiciones de la República de Cuba". Tesis para optar por el grado de Candidato a Doctor en Ciencias Veterinarias. I.S.C.A.H. San José de Las Lajas. La Habana, 1982.
31. Gall, D. ; Colling, A. ; Marino, O. ; Moreno E´. ; Nielsen, K. ; Perez, B. y Samartino L. (1998): Enzyme immunoassays for serological diagnosis of bovine brucellosis: A trial in Latin America. *Clin Diagn Lab Immunol* . Sep; 5(5): 654-61
32. García Carrillo, C. "Situación de la Brucelosis bovina en las Américas". III Reunión Internacional de Directores de Salud Animal. Buenos Aires, Agosto 1981. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica. 1982.
33. Gues, H. y Nowlan, P. F. (1998): "Identification of now-specific agglutination to Brucellas abortus using an EDTA modified seroagglutination in tube". *Vet. Rec.*4(2) : 27-31.
34. Heck, F.C.; Deyoe, B.L. and Willians, J.D. (1982): Antibodies to B. Abortus in sera from strain 19 vaccinated and non-vaccinated cows as determined by ELISA and conventional serologic methods. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. (3): 629-630.
35. Hornitzky, M. y Searson, J. (1986): "The relationship between the isolation of Brucella abortus and serological status of infectated, non-vacinated cattle". *Aust. Vet. J.* 5 (3): 17- 21.
36. Iannelli, D.; D´apice, L.; Fenizia, D.; Serpe, L.; Cottone, C.; Viscardi, M. and Lapparelli, R. (1998): Simultaneous identification of antibodies to Brucella abortus and Staphylococcus aureus in milk samples by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 36 (3): 802-6.

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 31

Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](#)®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 03, Marzo/2005. [Veterinaria.org](#)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](#)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505.html>

37. Instituto de Medicina Veterinaria (1967): Informe al Seminario de Zoonosis. La Habana, 6 al 12 de agosto.
38. Instituto de Medicina Veterinaria (1980): Brucelosis. Saneamiento y profilaxis en las especies domesticas. NRAG 291 Ministerio de la Agricultura. República de Cuba.
39. Instituto de Medicina Veterinaria (1982): Brucelosis. Método de ensayo NRAG 286 Ministerio de la Agricultura. República de Cuba.
40. Instituto de Medicina Veterinaria (1982): Protección contraepizoótica. Departamento de Vigilancia Epizootiológica. Ministerio de la Agricultura. República de Cuba.
41. Isloor, S.; Renukaradhya, G.J. y Rajasekhar, M. (1998): A serological survey of bovine brucellosis in India. Rev Sci Tech. Dec;17(3):781-5
42. Izquierdo, Maricela; Silva, E. y Martín, Regina Zonia (1998): Empleo del sistema ELISA DAVIH-BRU-2 para detectar anticuerpos frente a Brucella en mezclas de suero. Rev. Salud Anim. 20 (1): 1-3.
43. Jacobo, R. H. (1985): "Rosa de Bengala, Técnica de elección para un primer muestreo serológico". Vet. Argentina.
44. Jacobo, R.H. (1998): Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epiz. 17: 507-526
45. Kadohira, M. ; McDermott, J.J. ; Shoukri, M.M. y Kyule, M.N. (1997): Variations in the prevalence of antibody to brucella infection in cattle by farm, area and district in Kenya. Epidemiol Infect. Feb;118(1):35-41.
46. Kouba, V. (2000): History of the eradication of bovine brucellosis in the Czech Republic. Cas Lek Cesk Apr 26; 139 (8): 227 - 30
47. Kubuafor, D.K, ; Awumbila, B. y Akanmori, B.D. (2000): Seroprevalence of brucellosis in cattle and humans in the Akwapim-South district of Ghana: public health implications. : Acta Trop Jul 21;76(1):45-8
48. Laboratorios DAVIH (1995): Sistema micro ELISA para la detección de anticuerpos a Brucella en suero bovino. La Habana, Cuba.
49. Luna-Martínez, J.E. y Mejías, Claudia, E. (1998): Manejo del hato afectado. Panorama general en Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. SAGAR, UNAM, OPS. Acapulco, Guerrero, México 20-21 de julio.
50. MacMillan, A. y Buel, R. (1985): "Non-specific reaction to the Brucella abortus sat (correspondence)". Vet. Rec.5 (3):24- 29.
51. Mateo, A. y Martin-Castillo, M. "Estudios seroepidemiológicos de la Brucelosis en perros". Unidad de Patologías Infecciosas y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 1993.
52. Molar, E.; Molar, L. y Valle, W. G. (1998): Value of different serological test in the diagnosis of bovine brucellosis in the Amazonian region.
53. Molar, L.; Molar, E.; Barbosa, R. y Valle, W. G. (1998): Eradication of brucellosis ifrom a cattle herd in the Amazonian region.(Short communicationn).
54. Nielsen, K. H. y Wright, P.T. (1984): Enzyme immunoassay an its application to the detection of bovine antibody to Brucella abortus. Agriculture anada Animal Disease Research Institute , NEPEAN, p 63-76.
55. Nielsen, K.H. ; Gall, D. ; Kelly. W.; Henning, D. y Garcia M. (1992): . Enzyme immunoassay. Application to diagnosis of bovine brucellosis. . Agriculture Canada

56. Nielsen, K.H.; Gall, D. ; Jolley, M.; Leishman, G.; Balasevicius, S.; Smith, P.; Nicoletti, P. and Thomas, F. (1996 a): A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. J. Immunol. Methods. 195 (1-2): 161-8.
57. Nielsen, K.H.; Kelly, L.; Gall, D.; Gall, D.; Balasevicius, S.; Bosse, J.; Nicoletti, P. and Kelly, W. (1996 b): Comparison of enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Preventive Vet. Medicine. 26 (1): 17-32.
58. Nowlan, P. y Gues, H.(1985): "Use of EDTA modified antigen in the serodiagnosis of bovine brucellosis". Vet. Rec. 12(2) : 27-32.
- 59.
60. O.I.E. (1994): Informe de la reunión de la comisión de normas de la OIE. Paris, 19 – 22 de septiembre.
61. O.I.E. (1996): Bovine brucellosis. In Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines, p 242- 255, 3ra ed, OIE, Paris.
62. OPS (1994): Manual de Procedimiento de Control de Calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Washington.
63. OPS(1996): "Control de Zoonosis". Informe del Comité Mixto de Expertos en Brucelosis.
64. Ortiz, Eva.; Silva, E.; Nibot, Carmen.; Cabrera, C. e Izquierdo, Maricela. (2000): Estudio serológico de la brucelosis bovina Empleando el sistema DAVIH BRU 2. V. Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Palacio de Convenciones. La Habana, Cuba.
65. Percedo, María I.; Pérez, S.; Gonzáles, Isel.; Mérida, R. ; Alfonso, O. y Chávez, P. (1998): . Análisis de riesgo de desastres biológicos para la población animal. Rev. Salud Anim. 20 (1): 5-8.
66. Percy du Sart, A. ; Gauthier, D. ; Lecointre O. et D. Crevat. (1998): Diagnostic sérologique de la brucellose bovine: évaluation comparative d'une méthode Elisa et des méthodes traditionnelles. Revue Méd Vét, 142: 161-168.
67. Pérez, J.; Quezada, M.; López, J.; Casquet, O.; Sierra, M.A. and Martín de las Mulas, J. (1998): Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. J. Vet. Diagn. Invest. 10 (1): 17-21.
68. Pfeiffter, D. (1986): "Epidemiology and Economics of bovine Brucellosis in Cardaba province of Colombia". Inaguoral Dissertation, Justus-Liebig. Univer. Gienssen.
69. Plommet, M.(1972): "Survie the *Brucella abortus* dans le lisier the bovins. Desinfection par le xylene". Ann. Rech. Vet. . 10 (2): 19-23.
70. Priadi, U. N.; Hirst, R. G.; Soeroso, M. y Koesharyono, C.(1992): "Infección de *Brucella suis* como Zoonosis en Java". Balai Penelitian Veteriner. Bogor. Indonesia. 24 (44):110-112.
71. Raybould, T. J. G. y Chantler, S. (1980): "Serological differentiation between infected and vaccinated cattle by using purified soluble antigens from *B. abortus* in a hemagglutination system. Infec. and Immunol. 29(2): 435-441.
72. Reviriego, F.J. y Cermeño de Giles, J. (1997): ELISA Indirecto en el diagnóstico de la Brucelosis bovina. Evaluación y comparación con la Fijación de Complementos. Información Veterinaria. Ciencias veterinarias No. 46. Colegios Veterinarios de España.

Cabrera Pérez, Carmelo; Silva Cabrera, Eladio; Izquierdo Márquez, Maricela; García Montero, Consuelo. 33

73. Rhaway, N. "Manual Merck de Veterinaria". España. 1993.
74. Samartino, L.; Gall, D.; Gregoret, R. y Nielsen, K. (1999): Validation of enzymelinked inmunoorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis.
75. Samartino, L.; Gregoret, R. ; Gall, D.; y Nielsen, K. (1999): Fluorescence polarization to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina.
76. Samartino, L.; Navarro, F.; Gregoret, R. La Aplicación de la Técnica Antígeno Buferado en Placa (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la Brucelosis. IV Jornada Científica-Técnica. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Cordoba. Argentina. 20 y 21 de Agosto de 1997.
77. Seoane, G. (2000): Situación de la brucelosis bovina en Cuba. Informe Técnico Instituto de Medicina Veterinaria . Ministerio de la Agricultura. República de Cuba.
78. Silva, I. ; Dangolla, A. Kulachelvy, K. (2000): Seroepidemiology of Brucella abortus infection in bovids in Sri Lanka. Prev Vet Med . Jul 3; 46(1):51-9.
79. Stryszak, A. (1986): "Value of the Rose Bengal Plate Test in Diagnosing Brucellosis". Polskie. Archi. Wetrynar. 142: 161-168.
- 80.
81. Tablada, Lidia.; Abeledo, María, A. (1979): La Seroaglutinación Lenta en el Diagnóstico de la Brucelosis bovina. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 10 (2): 127-131.
82. Thoen, C.O.; Haas, C.A.; Angus, R.D. and Townsend, A.S. (1995): Evaluation of a potassium chloride extract of Brucella abortus in an Elisa for detecting Brucella antibodies in bulk tank milk samples from cows. Vet. Microbiol. 45 (2-3): 185-189.
83. Vanzini, V.R.; Aguirre, N.; Lugaresi, C.I.; de Echaide, S.T.; de Canavesio, V.G.; Guglielmo, A.A. ; Marchesino, M.D. and Nielsen, K. (1998): Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. Prev. Vet. Med. Sep. 1; 36(3): 211-7
84. Vera, A.; Seone, G.; Serrano, E. y Fernández, A. (1999): Evolución de la brucelosis bovina en Cuba. Perspectivas. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 25(1): 3-7.
85. Wright, P. F. (1998): International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 17: 527- 533.

Trabajo recibido el 01.02.05 nº de referencia 050505_REDVET. Enviado por su autor principal. Publicado en REDVET® el 01/05/05.

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#)

(Copyright) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](#)
- [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#)