



Aplicación de la prueba de fluorescencia polarizada para la detección de brucelosis

CARLOS RAMÍREZ PFEIFFER*, RICARDO GÓMEZ FLORES**, CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA**

Las pruebas prescritas por la Organización Mundial para la Salud Animal para el diagnóstico de la brucelosis en ganado son: las pruebas de antígeno amortiguado (PAA) (Rosa de Bengala [PRB] y la prueba de aglutinación amortiguado en placa [PAPA]), la prueba de fijación del complemento (PFC), la ELISA indirecta (IELISA), la ELISA competitiva (CELISA) y la prueba de fluorescencia polarizada (PFP). Las PAA, la PFC y la IELISA, pero no la CELISA y la PFP, se afectan significativamente con anticuerpos resultantes de inmunización con *Brucella abortus* S19.^{2,10,11,17} En cabras y ovinos, las pruebas aprobadas por la OIE son la PRB y la PFC, aunque no se han evaluado con un análisis estadístico en forma similar al de las pruebas realizadas en bovinos;¹⁴ además, tienen baja especificidad (probabilidad de identificar correctamente como negativos aquellos animales que son realmente negativos), y se afectan con anticuerpos resultantes de vacunación por la cepa Rev. 1 de *B. melitensis*.^{3,4} Sin embargo, se considera que su alta sensibilidad (probabilidad de identificar correctamente como positivos aquellos animales que son realmente positivos)²¹ llena los requerimientos para la vigilancia en áreas a nivel de rebaño, y que la PRB y la PFC deben emplearse en procedimientos de pruebas seriadas

para obtener una sensibilidad y especificidad confiable en los programas de prueba y sacrificio.^{7,17} La PRB (prueba de tarjeta) es fácil de desarrollar, no es costosa y se realiza tanto en campo como en laboratorio; en contraste, la PFC es problemática y relativamente costosa, y sus resultados son lentos; lo difícil del procedimiento dificulta que se utilice en países como México,¹⁸ donde la enfermedad es endémica y la mayoría del diagnóstico se analiza con la PRB sola, causa el sacrificio innecesario de cabras y aumenta el costo beneficio de la erradicación.

Los antígenos de PRB, PAPA y PFC se preparan a partir de *B. abortus* S1119-3.^{1,17} Para la PRB las células se tiñen con rosa de Bengala, y se ajustan a una concentración de 8% células, lo que se conoce como PRB8, en un diluyente amortiguado; para la PAPA se usan los colorantes cristal violeta y verde brillante, y se ajusta a una concentración de 11% de células, con un diluyente amortiguado; para la PFC se usan las células sin teñir, a una concentración de 4.5%. Si la PFC no está disponible o si no es posible utilizarla simultáneamente con la PRB en programas de erradica-

*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Campo Experimental Río Bravo, Río Bravo, Tamaulipas, México.

**Laboratorio de Inmunología y Virología, FCB-UANL.

ción,¹⁷ el antígeno PRB se puede modificar a un volumen de 3% de células, lo que se conoce como PRB3, para incrementar su sensibilidad,^{3,4,17} como lo demostraron Díaz *et al.*⁵ al encontrar que la PRB3 tenía 19% más sensibilidad que la PRB8 en un estudio aplicado a cabras infectadas y no vacunadas. Sin embargo, la baja concentración de células en el antígeno disminuye su especificidad.

El lipopolisacárido (LPS) es el antígeno más relevante y se aplica en las pruebas convencionales de brucelosis,¹ y por ello los anticuerpos derivados de la vacunación con la cepa Rev. 1 de *B. melitensis* usualmente interfieren con el diagnóstico.^{3,4,17} Para evitar esto, la CELISA se utiliza para inhibir la detección de anticuerpos vacunales, pero no anticuerpos derivados de cepas de campo.¹³

Biancifiori *et al.*² encontraron que la CELISA (usando las PRB y PFC como pruebas de selección) resultaba en una sensibilidad de 99.4% y una especificidad de 98.9% en muestras de ovinos y caprinos, mientras que en muestras de vacunados la CELISA tenía valores de 89.0% de sensibilidad y 90.3% de especificidad. En otro estudio en cabras mexicanas con estado de vacunación desconocido, Nielsen *et al.*¹⁵ mostraron que la sensibilidad y especificidad de la prueba de IELISA era de 96.2% y 99.7%, mientras que la CELISA tenía 93.6% y 99.4%, respectivamente, relativas a PAPA y PFC. A pesar de esos resultados promisorios, las ELISAs requieren estandarizarse en forma apropiada para su aplicación en cabras.¹⁷

Entre algunos estudios para la detección de anticuerpos contra brucelosis en cabras, relativos a PAPA y PFC, se encuentran los de Nielsen y Gall,¹² quienes establecieron que la PFP tenía 94.9% y 99.4% de sensibilidad y especificidad, respectivamente. De forma similar, en muestras de cabras mexicanas, Nielsen *et al.*^{14,15} encontraron 88.7-92.7% y 98.9-99.8% de sensibilidad y especificidad, respectivamente; mientras que un estudio con PFP¹⁸ con muestras de una zona de

alta prevalencia y vacunación observó 83.5% de sensibilidad, 82.2% de especificidad y 88.2% de certeza, relativas a PRB3 y PFC. La PFP también posee una mayor especificidad (84.1%) que la PRB3 (65.7%), y mostró 95.8% de especificidad con 702 muestras negativas de animales no vacunados;¹⁸ se sugirió que la PFC no se empleara como confirmatoria, y que la PRB3 no es apropiada para aplicarse en zonas de alta prevalencia con vacunación, y que el uso de la PFP podía ayudar a disminuir el número de diagnósticos erróneos causada por falsos positivos.¹⁸

El presente estudio se llevó a cabo para comparar el desempeño de las pruebas aprobadas por la OIE (PRB3, PRB8, PAPA, PFC y PFP)¹⁷ para detectar anticuerpos contra *Brucella* en muestras de cabras de una zona de alta prevalencia y vacunación, usando la combinación de IELISA y CELISA (I/C-ELISA) para clasificar las muestras y para evaluar la combinación de pruebas en serie con pruebas fáciles de aplicar como pruebas de escrutinio y para las muestras positivas a las pruebas de escrutinio secundarias.

Material y métodos

Se hicieron dos estudios para comparar el desempeño de las pruebas de la OIE con la PFP para el diagnóstico de la brucelosis. En el primero se evaluó la eficacia de las pruebas para confirmar muestras clasificadas como positivas y negativas, por cada combinación de clasificación. Para esto los resultados de las pruebas mexicanas (PRB3, PRB8 y PFCC) y las canadienses (PAPA, PFCC y PFP) se compararon con sueros de cabras clasificadas como positivas y negativas por la combinación de I/C-ELISA. En el segundo estudio, con los resultados del primero, se realizaron combinaciones de pruebas seriadas. Para esto, las pruebas de escrutinio, fáciles de realizar y elevada sensibilidad, se siguieron por pruebas confirmatorias de elevada especificidad para mejorar el resultado final y determinar el procedimiento más útil que se pudiera aplicar en forma rutinaria en campo y

laboratorio en áreas de alta prevalencia y vacunación. De acuerdo a los resultados del primer estudio, las pruebas fáciles de escrutinio que se seleccionaron fueron las mexicanas PRB3 y PRB8 y las canadienses PAPA y PFP, y las muestras positivas a éstas se confirmaron a través de pruebas de elevada especificidad.

Muestras de sueros. Para este estudio se obtuvieron 534 muestras de sueros del Banco de Sueros del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL). Estas muestras formaron parte del programa de erradicación en Nuevo León, donde la vacunación puede alcanzar 80% de la población de cabras y la prevalencia de la infección por *Brucella* se considera entre 2% y 4% (Muraira, comunicación personal). Resultados previos de muestras de PRB3 y PFC también se obtuvieron del LIV; sin embargo, no estuvieron disponibles los datos de infecciones comprobadas y no se conocía el estado de las vacunaciones.

Las muestras se clasificaron como positivas o negativas, y se usaron pruebas en serie con IELISA como prueba de escrutinio y CELISA como confirmatorias, como se describió anteriormente. Se identificaron parte de las muestras y se enviaron congeladas con entrega al día siguiente al Laboratorio Regional de Referencia y Expertos en Brucelosis de la OIE en Ottawa, Fallowfield (OLF), Nepean, Ontario, Canadá, para evaluarse mediante PAPA, CELISA y IELISA. Las muestras remanentes se enviaron al Laboratorio Regional Central de Monterrey (LRCM), laboratorio acreditado en brucelosis, en el cual se habían practicado CT3 y PFCm, para que se evaluaran mediante PRB8.

Pruebas serológicas

Se compararon pruebas mexicanas y canadienses; las mexicanas (m) incluyeron las PRB3, PRB8 y PFCm, mientras que las canadienses (c) fueron las PAPA, PFCc, IELISA y CELISA. Las pruebas PRB3, PRB8 y PFCm se practicaron en el LRCM

con antígenos y procedimientos descritos por la NOM,¹⁶ que son los mismos descritos por la OIE.¹⁷ La PAPA y PFCc se realizaron en el OLF con antígenos y procedimientos descritos previamente por la OIE.¹⁷

La PFP se realizó en el LIV, de acuerdo al procedimiento previamente descrito,¹¹ y se usó como marcador el polisacárido O de *B. abortus* conjugado con isotiocianato de fluoresceína, el cual se preparó en el OLF. Brevemente, 25 µL de cada muestra de suero de cabra se diluyeron en 1 ml de 0.1M de amortiguador Tris. Después de mezclarlo, se realizó una lectura de blanqueo con un analizador de fluorescencia polarizada (Sentry FP, Diachemix LLC., Grayslake, IL); posteriormente se añadieron 10 ml del marcador a la muestra diluida y después de 2 min de incubación, se obtuvo una lectura final. Se prepararon muestras combinadas de sueros de cabras (positivas fuertes, positivas débiles y negativas), y se ajustaron sus respuestas de lecturas respectivas con los sueros estándares de PFP de la OIE y usados como controles diarios. Las pruebas de IELISA y CELISA se realizaron en el OLF, conforme a lo descrito por Nielsen *et al.*¹¹

Para la IELISA, se utilizó el LPS liso extraído de *B. abortus*, cepa 1119-3, inmovilizada en matriz de poliestireno, como antígeno. Las muestras de suero diluidas 1:50 fueron añadidas después de lavar con PBST los pozos de las placas de 96 pozos. La reactividad se determinó con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la inmunoglobulina G1 (IgG1) de bovino y conjugada con peroxidasa de rábano. Este anticuerpo monoclonal tiene una fuerte reacción con IgG de ovinos y cabras.⁹ Para la CELISA se usó el SLPS como antígeno; se diluyeron muestras de suero (50 µL) 1:10, y se añadieron a cada pozo seguidas de un volumen igual del anticuerpo monoclonal específico para una molécula del epítipo del OPS del LPS-liso. Se detectó la reactividad al anticuerpo de ratón con anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano, disponible comercialmente. Se utilizaron el

peróxido de hidrógeno y el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Sigma-Aldrich, San Louis, MO) como sustratos. Después se incubaron muestras en reacción contra IELISA y CELISA por 10 min, y se determinaron las densidades ópticas en un espectrofotómetro a 414 nm. Las pruebas en OLF y LRCM se realizaron en forma ciega y sus respectivos resultados se incluyeron en una base de datos. No fue posible examinar todos los sueros con todas las pruebas, debido a la depleción de los sueros.

Expresión de datos para las pruebas serológicas y combinación de pruebas

A. Las muestras probadas por I/C-ELISA se consideraron como negativas, si los resultados de IELISA eran negativos; o si fueron IELISA, positivos; y CELISA, negativos; y como positivas si los resultados de ambos eran positivos.

B. Pruebas de escrutinio individuales. Para las pruebas PRB3, PRB8 y PAPA, los resultados positivos o negativos se determinaron, respectivamente, por la presencia o ausencia de aglutinación visible.^{16,17} Para la PFCc¹⁵ los resultados positivos se determinaron con 50% de hemólisis de las células indicadoras diluidas 1:5, mientras que para la PFCm¹⁶ se usaron diluciones de suero a una concentración > 1:4, como valor de corte.

El punto de corte de la PFP se determinó con el análisis de las características del operador receptor (ROC).¹¹ Para el IELISA se calculó el porcentaje de positividad de los datos basados en un control positivo fuerte incluido como control en cada placa; mientras que para el CELISA el porcentaje de inhibición (%I) se calculó con un control de amortiguador (no inhibido), incluido en cada placa. Todas las placas de ELISAs contenían los siguientes sueros controles: positivo fuerte, positivo débil y negativo y un control amortiguador sin suero, la CELISA, además, contenía un suero control de un animal vacunado.

C. Para las combinaciones de pruebas, PAPA, PRB3 y PRB8 se seleccionaron como pruebas de

escrutinio y PFCm, PFCc, PFP y PAPA como confirmatorias para los sueros positivos a las pruebas de escrutinio, relativas a I/CELISA. Los resultados negativos se identificaron por pruebas negativas a las pruebas de escrutinio o positivas a las pruebas de escrutinio y negativas a las pruebas de confirmación.

Análisis de datos

En el primer estudio se practicó el análisis ROC con la ayuda del programa MedCalc (Frank 15 Shoonjans, V.8.1.0.0), para evaluar la eficacia de las pruebas en discriminar resultados positivos y negativos previos a través de la combinación del criterio de clasificación de pruebas. El análisis ROC grafica la relación entre el rango de verdaderos positivos y verdaderos negativos relacionados con diferentes puntos de corte, que pueden seleccionarse para propósitos de escrutinio o confirmación,²⁰ además proporciona información sobre el mejor valor de corte de las pruebas, la sensibilidad, especificidad y el área bajo la curva ROC (AUC), que es un indicador de la certeza de la prueba.¹¹ Se calculó el índice de desempeño (PI) de las pruebas sumando los valores de la sensibilidad y especificidad para cada prueba y las combinaciones.⁸

En el segundo estudio, para obtener la especificidad final, se usó el programa MedCalc para realizar el análisis ROC de las pruebas confirmatorias (PFCc, PFP, PFCm y PAPA) realizado a las muestras positivas a las pruebas de escrutinio (PAPA, PRB3 y PRB8). El valor de corte óptimo también se calculó a partir del programa MedCalc; este valor calculado es diferente para las pruebas, si éstas se utilizan solas o en combinaciones para incrementar la sensibilidad o especificidad (ver tablas I y II).

Resultados

Se comparó el desempeño de pruebas serológicas, AUC, sensibilidad, especificidad y PI de dife-

Tabla I. Resumen del desempeño de pruebas serológicas individuales relativas a la combinación IELISA y CELISA. Se utilizaron muestras de sueros de cabras.^a

Prueba	Punto de corte	Área bajo la curva	Sensibilidad %	Especificidad %	Índice de desempeño
PFCc	> 1:5	0.915	98.4	84.8	183.2
PAPA	> 0	0.897	98.4	81.0	179.4
PPF ^b	> 108 mP	0.868	57.7	97.1	154.8
PPF ^c	> 98 mP	0.868	78.1	89.3	167.4
PPF ^c	> 88 mP	0.868	87.6	57.3	144.9
RBT8	> 0	0.808	92.8	68.8	161.6
PFCm	> 1:4	0.805	83.7	65.5	149.2
PRB3	> 0	0.661	99.7	32.5	132.2

^a Ver los datos de expresión e interpretación en la sección de Material y métodos.

^b Prueba de fluorescencia polarizada. El punto de corte >98 mP se seleccionó por el software como el valor en mP que maximiza la sensibilidad y especificidad.

^c Se presentan valores >100 y > 88 mP de la prueba de fluorescencia polarizada por razones de comparación de diferentes puntos de corte.

rentes pruebas y combinaciones de pruebas con sueros de cabra previamente clasificados con la combinación I/C ELISA. El número de muestras que se seleccionaron con I/C ELISA se muestra en la tabla III, mientras que la tabla I muestra el desempeño de las diferentes pruebas evaluadas. Se observa que las pruebas con mejores certezas (AUC x 100) fueron 91.5% para PFCc, 89.7% para PAPA, 86.8% para PFP, 80.8% para PRB8, 80.5% para PFCm, y 66.1% para PRB3; mientras que los PIs variaron con el orden del desempeño PFC > PAPA > PFP > PRB8 > 15 PFCm > PRB3 (tabla I).

Comparación de desempeño de pruebas seriadas

El número de sueros de cabras positivos y negativos que se seleccionaron por I/C ELISA para determinar pruebas confirmatorias que incrementen la especificidad de las pruebas de escrutinio se observa en la tabla IV y los resulta-

Tabla II. Desempeño de las series de pruebas para detectar anticuerpos contra *Brucella* en muestras de suero de cabras, relativas a I/C-ELISA. Se utilizaron pruebas primarias como de escrutinio y pruebas confirmatorias para muestras positivas.

Prueba	Prueba de escrutinio			Prueba confirmatoria			
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	ID ^a	Prueba secundaria	Especificidad final (%)	Intervalo de confianza 95%	ID ^b
PAPA	98.4	81	179.4	PFCc	91.7	73.0- 98.7	190.1
				PPF >98	90	68.3- 98.5	188.4
RBT3	99.7	32.5	132.2	PPF >99	91.2	81.8- 96.7	190.9
				FC >8	90.5	77.8- 93.3	190.2
				PAPA	73.5	63.6- 81.9	173.2
				FC >4 ^c	65.5	54.3- 75.5	165.2
				RBT8	63.1	0.2- 74.7	162.8
RBT8	92.8	68.8	161.6	FC >8 ^d	94.7	73.9- 99.1	187.5
				PPF > 97	91.3	71.9- 98.7	184.1
PAPA	69	49.2- 84.7	161.8				
PPF >98 ^e	78.1	89.3	167.4		89.3	81.7- 94.5	167.4

^a ID = índice de desempeño. Se obtiene mediante la suma de los valores de sensibilidad y especificidad de una prueba primaria.

^b El índice de desempeño se obtuvo mediante la suma de los valores de sensibilidad de la prueba primaria y su valor final de especificidad.

^c Series de pruebas que se utilizan comúnmente para el diagnóstico de brucelosis de cabras de acuerdo a la NOM (1996).

^d Series de pruebas que se utilizan comúnmente para el diagnóstico de brucelosis de bovinos de acuerdo a la NOM (1996).

^e La PFP se muestra como una prueba comparativa, como el resultado de una prueba. El punto de corte para cada prueba de PFP o series de pruebas fue seleccionado por el software como el valor en que maximiza la sensibilidad y la especificidad.

Tabla III. Número de positivos y negativos para varias pruebas. Se utilizaron muestras de sueros de cabras seleccionadas con la combinación de IELISA y CELISA (I/C-ELISA).

Muestras	Positivas a I/C-ELISA	Negativas a I/C-ELISA	Prueba	Pruebas positivas	Pruebas negativas
508	370	138	PFCc	364	116
518	371	147	PAPA	365	119
345	242	103	PFP >98	189	92
316	223	93	RBT8	207	64
385	301	84	PFCm	252	55
532	381	151	RBT3	380	49

Tabla IV. Número de positivos y negativos para varias series de pruebas. Se utilizaron sueros negativos por I/C-ELISA.^a

Negativos a I/C-ELISA	Prueba 1	Positivos a la prueba 1	Prueba 2	Negativos a la prueba 2
137	PAPA	27	PFCc	16
139	PAPA	20	PFP >8	18
103	RBT3	68	PFP >99	62
84	RBT3	84	PFCm>8	73
121	RBT3	72	PAPA	72
151	RBT3	102	PFCm>4	55
93	RBT3	65	PRB8	41
151	RBT8	101	PFCm>8	87
70	RBT8	23	PFP >97	2
91	RBT8	29	PAPA	20

^a Las muestras positivas a la prueba 1 se volvieron a probar (prueba 2) para obtener muestras falsas positivas.

dos de la especificidad final, y el ID obtenido con la prueba confirmatoria respectiva se observa en la tabla II. Los ID variaron, siendo el orden de desempeño de PRB3+PFP (>99 mP) > PRB3+FC>4 (la combinación oficial de la NOM) > el resto de combinaciones (tabla II).

Discusión

Se comparó el desempeño del diagnóstico de las pruebas aceptadas por la OIE *versus* PFP y combinaciones de pruebas, con muestras de suero de cabras obtenidas en un área de alta prevalencia y vacunación. Los sueros se obtuvieron para la campaña de brucelosis en el noreste de México y algunas de ellas se utilizaron en un estudio reciente

de brucelosis.¹⁸ Se escogieron procedimientos de pruebas seriadas, consistentes en una combinación de IELISA como prueba de escrutinio y CELISA como prueba confirmatoria para muestras positivas (I/C-ELISA), para clasificar las pruebas, dado que el aislamiento de *B. melitensis* no estaba disponible y el estatus de vacunación con *B. melitensis* Rev.1 era incierto; los resultados de los indicadores del desempeño

de las pruebas evaluadas se obtuvieron en relación a los resultados de I/C-ELISA.

Se ha reportado que la IELISA es la prueba más sensible, pero menos específica que la CELISA, y ésta como más específica, pero menos sensible que la IELISA, además de que sus resultados no se afectan significativamente con anticuerpos derivados de reacciones cruzadas y vacunación.¹³ Los procedimientos de pruebas en serie se utilizan para incrementar la especificidad del diagnóstico, en ellas la sensibilidad se obtiene por la prueba de escrutinio cuya relativa baja especificidad se incrementa al aplicar la prueba confirmatoria a los positivos. En el presente estudio se observó que las PFCc, PAPA y PFP obtuvieron mejor certeza (91.5%, 89.7% y 86.8%, respectivamente) y PI (183.2, 179.4 y 167.4, respectivamente) que las PRB8, PFCc y PRB3 (certeza 80.8%, 80.5% y 66.1%; PI = 161.6, 149.2 y 132.2, respectivamente).

También se observó una diferencia significativa entre los resultados de las PFC mexicana y canadiense, cuyos resultados fueron, respectivamente, 98.4% y 84.9% para la PFCc contra 83.7% y 65.5% para la PFCm (tabla I). Publicaciones anteriores sobre la PFC^{3,6,12} en donde obtuvieron 88.5%, 85.9% y 95.9%, respectivamente, apoyan nuestros resultados.

En contraste, Díaz *et al.*⁵ encontraron que la PFC obtuvo 100% de especificidad en muestras de sueros de animales no infectados. Además, se encontró que la sensibilidad y especificidad de la PFP (>98 mP) relativa a I/C-ELISA fue de 78.1%

y 89.3% (PI = 167.4), respectivamente, lo que fue menor al 88.7% y 98.9% relativos a PAPA/PFCc de un estudio previo¹⁵ pero similar a 82.1% y 82.2%, relativo a PRB3 y PFCc.¹⁸

Estos resultados conflictivos pueden explicarse por el hecho de que los resultados de la PRB y de PFC se pueden afectar a partir de anticuerpos inducidos por vacunación con Rev. 1;^{4,7,17} al respecto, Ramírez-Pfeiffer *et al.*¹⁸ encontraron 35.9% de falsos positivos de la PRB3 al compararse con la PFCm en muestras de cabras con vacunación y elevada prevalencia de brucelosis en cabras.

Nuestros resultados muestran que de las pruebas que se evaluaron, la PRB3 tuvo el índice de desempeño más bajo. Además, las diferencias que se observaron en las pruebas se pueden deber a la forma de selección de las muestras;¹⁵ debido a que cuando se comparan pruebas nuevas que diferencian anticuerpos de animales infectados y vacunados con la PRB y PFC y se usan sueros de animales vacunados o revacunados, éstas pueden resultar negativas, favoreciendo los resultados de las pruebas convencionales.

Además, las diferencias entre los resultados de las pruebas canadienses y mexicanas coinciden con Gall y Nielsen,⁸ quienes, al analizar 37 juegos diferentes de resultados publicados entre 1969 y 2003, encontraron que el promedio de las PIs para PRB y la PFCs fueron de 167.6 y 172.5, respectivamente, con un coeficiente de variación mayor (14.8% y 14.1%, respectivamente) que el resto de las pruebas incluidas en el estudio. Por otro lado, en ese estudio, PAPA y PFP dieron los PIs más elevados y la menor variabilidad (193.1, 3.3% y 196.4, 4.4%, respectivamente).

Los resultados encontrados sobre el desempeño de pruebas sencillas muestra también que la PFP > 98 mP ofrece 89.3% de especificidad, y que al modificar el punto de corte a un valor de >108 mP, se incrementa la especificidad a 97.1% (tabla I). Este ajuste del punto de corte a las sensibilidades y especificidades que se hace en diferentes situaciones epidemiológicas hace a la PFP una prueba conveniente para utilizarse en el diagnóstico de

brucelosis en cabras, cuando la sensibilidad no es crítica o cuando no se encuentran disponibles otras pruebas, particularmente en áreas de bajo desarrollo con alta vacunación, como las encontradas comúnmente en México. Las pruebas confirmatorias, incluyendo las PFC y las ELISAs, son difíciles de desarrollar en los laboratorios mexicanos, debido a los programas de vacunación.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con Ramírez-Pfeiffer *et al.*¹⁸ en que la PRB3, a pesar de su elevada sensibilidad (99.7%), tiene la más baja especificidad (32.5%), y es necesario que todos los positivos se confirmen con otras pruebas para disminuir el sacrificio innecesario de cabras por falsos positivos. Además, los resultados con pruebas de escrutinio sugieren el uso de la PRB8 con menor sensibilidad, pero mayor especificidad que la PRB3; esto se apoya en el hecho de que la PRB (con 82.9% de sensibilidad) ofrece 68.8% de especificidad, lo que es todavía mayor que 65.5% de especificidad obtenido por la combinación de PBR3+PFCm >1:4. Aunque esto puede permitir la presencia de un pequeño número de animales infectados sin detectar en el rebaño, podría ser económicamente más deseable cuando una prueba confirmatoria no está disponible. En las combinaciones de pruebas se observó que cuando se utilizó la PFP como confirmatoria para los positivos a las pruebas PRB3, PRB8 y PAPA, la especificidad aumentó de 68.8%, 32.5% y 16.81% a 91.3%, 91.2% y 90%, respectivamente, que fue mayor que los valores con otras combinaciones evaluadas (tabla II).

De hecho, la especificidad de las pruebas oficiales en México, PRB3+PFCm >1:4, aumentó de 32.5% a 65.5%, que representa el menor valor para todas las combinaciones de pruebas evaluadas, y fue cercano al valor de 61.5% descrito previamente para PAPA por Nielsen *et al.*,¹⁵ en cabras no vacunadas. Sin embargo, cuando se empleó la PFCm >1:8 como confirmatoria para los positivos a PRB3, la especificidad aumentó de 32.5% a 90.5%; combinación que se puede adoptar fácilmente de acuerdo a NOM para re-

ducir el número de falsos positivos. De forma similar, cuando la PFCm >1:8 se usó como confirmatoria para los positivos a PRB8, la especificidad incrementó de 68.8 a 94.7%, a pesar de la relativa baja sensibilidad (92.8%) de la PRB8.

Es importante mencionar que la PFP (>98 mP), cuando se utiliza como prueba única, tiene 89.3% de sensibilidad, la que aumenta a 91.2% (> 99 mP) o 97.1% (>108 mP) cuando se usa con la PRB3 (tabla II). Los resultados del presente estudio concuerdan con los de Nielsen *et al.*¹⁴ quienes sugieren que la PFP se puede aplicar para el diagnóstico serológico de brucelosis en pequeños rumiantes y que en pruebas seriadas de I/C-ELISA son mejores que el método convencional de PRB3+PFC; es posible que una combinación de aglutinación amortiguadas con la combinación de positivos por medio de PFP se pueda aplicar de forma rutinaria como una prueba de diagnóstico de brucelosis caprina, particularmente en laboratorios con pocos recursos.

Además, los resultados obtenidos favorecen el uso de la PFP sola en zonas de bajos recursos con alta vacunación y prevalencia, ya que es posible ajustar su valor de corte para aumentar o disminuir la sensibilidad o la especificidad en diferentes situaciones epidemiológicas. Por ejemplo, la PFP con un valor de corte >88 mP provee 87.6% de sensibilidad, a diferencia de 78.1% con un punto de corte de >98 mP (tabla I); mientras que con >108 mP provee una especificidad de 97.1%, en lugar de 89.3% con >98 mP. El costo del lector de fluorescencia polarizada se puede compensar con la reducción del sacrificio de cabras por errores del diagnóstico, y además se puede utilizar en el diagnóstico de brucelosis en bovinos y cerdos.¹⁷ Asimismo, se están desarrollando otros marcadores para diferentes enfermedades, haciendo a la PFP una tecnología de elección muy versátil.

Resumen

En el presente estudio las pruebas de diagnóstico de la Organización Mundial de Salud Animal se

compararon con la prueba de fluorescencia polarizada (PFP), sola y en combinación, usando las ELISA indirecta y competitiva como variable de clasificación para sueros de cabras obtenidas en una zona de alta prevalencia y vacunación. La sensibilidad y especificidad relativas fueron, respectivamente, 99.7% y 32.5% para la PRB3, 92.8% y 68.8% para la RBT8, 98.4% y 84.8% para la PFC canadiense, 83.7% y 65.5% para la PFC mexicana, y 78.1% y 89.3% para la PFP. El uso de la PFP como prueba confirmatoria en combinación con otras pruebas aumentó significativamente la especificidad final de las pruebas de escrutinio; PAPA, PRB3 y PRB8 más PFP resultaron en 90%, 91.2% y 91.3% de especificidad final, respectivamente, mientras que las especificidades para las combinaciones PRB3+PFC mexicana, PRB8+PFC mexicana, y PAPA+PFC canadiense, fueron 65.5%, 63.2% y 91.7%, respectivamente. Sugerimos que la PFP se puede aplicar de forma rutinaria como una prueba de escrutinio para el diagnóstico de la brucelosis caprina y como confirmatoria en pruebas seriadas.

Palabras clave: Brucelosis caprina, ELISA, Fluorescencia polarizada, Cabras.

Abstract

In the present study, the World Organization for Animal Health diagnostic tests were compared with the fluorescence polarization assay (FPA), alone and in combination, using the indirect ELISA and competitive as variable classification for goat serum obtained in a zone of high prevalence and vaccination. The relative sensitivity and specificity were 99.7% and 32.5% respectively for the complement fixation test 3% (CFT3), 92.8% and 68.8% for RBT8, 98.4% and 84.8% for the Canadian CFTs, 83.7% and 65.5% for Mexican CFTs, and 78.1% and 89.3% for the FPA. The use of the FPA as a confirmatory test in combination with others significantly increased final specificity for screening tests; buffered plaque aggluti-

nation test (BPAT), CFT3, and CFT8 plus FPA resulted in 90%, 91.2%, and 91.3% final specificity respectively; whereas the specificities for combinations CFT3 + FPA, Mexican CFT8 + FPA, Mexican and Canadian BPAT + CFTs, were 65.5%, 63.2%, and 91.7% respectively. We suggest that the FPA can be routinely applied as a screening test for diagnosis of goat brucellosis, and as confirmatory in serial testing.

Keywords: Goat Brucellosis, ELISA, Fluorescence Polarization Assay (FPA), Goat.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Nuevo León (Cocytenl) para RGF. Agradecemos a José G. Muralla, Guadalupe Alvarado y Blanca Eguía, del Laboratorio Regional Central de Monterrey, por proveer las muestras de suero.

Referencias

1. Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus y J.M. Verger. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 147, rue de l'Université 75007 Paris, France, 1988, p. 63.
2. Biancifiiori, F., F. Garrido, K. Nielsen, L. Moscati, M. Duran y D. Gall. Assessment of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked immunoassay (CELISA) for diagnosis of brucellosis in infected and Rev-1 vaccinated sheep and goats. *Microbiológica* 2000, 23:399-406.
3. Blasco, J.M., B. Garin-Bastuji, C.M. Marin, G. Gerbier, J. Fanlo, M.P. Jiménez de Bagues y C. Cau. Efficacy of different rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.* 1994, 134: 415-420.
4. Díaz-Aparicio, E., C. Marin, B. Alonso-Urnameta, V. Aragon, S. Pérez-Ortiz, M. Pardo, J.M. Blasco, R. Díaz, and I. Moriyon. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Brucella melitensis* Infection of goats. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32:1159-1165.
5. Díaz, A.E., J.M. Blasco M. y F. Suárez G. Prueba de tarjeta para diagnóstico de la brucelosis caprina. *Vet. Mex.* 1999, 30:307-311.
6. European Commission. Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*) In: R. Ahl (ed.), Report of the Scientific Committee on animal Health and Animal Welfare. Health & Consumer Protection Directorate-General, 2001, pp. 35-36.
7. Gall, D. y K. Nielsen. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. Sci. Tech.* 2004, 23:989-1002.
8. Henning D., and K. Nielsen. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulins with immunoglobulins of other species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992, 34:235-245.
9. Nielsen, K., J. Cherwonogrodsky, R. Duncan, and D. Bundle. Enzyme immunoassay for the differentiation of antibody response to *Brucella abortus* infected and vaccinated cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50:5-9.
10. Nielsen, K., D. Gall, G. Jolley, S. Leishman, P. Balsevicus, P. Smith, P. Nicoletti y F. C. Thomas. A homogeneous fluorescence polarization antibody assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Meth.* 1996, 195:161-168.
11. Nielsen, K. y D. Gall. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: A Review. *J. Immunoassay Immunochem.* 2001, 22:183-201.
12. Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 2002, 90:447-459.
13. Nielsen, K., D. Gall, P. Smith, S. Balsevicus, F. Garrido, F. M. Durán, F. Biancifiiori, A. Dajer, E. Luna, L. Samartino, R. Bermudez,

- F. Moreno, T. Rentería y A. Corral, A. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004, 23:979-987.
14. Nielsen, K., D. Gall, P. Smith, R. Bermúdez, F. Moreno, T. Renteria, A. Ruiz, L. Aparicio, S. Vázquez, A. Dajer, E. Luna, L. Samartino y G. Halbert. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. Small Rum. Res. 2005, 56:253-258.
 15. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los animales. Diario Oficial de la Federación. México, D.F., 20 de agosto 1996.
 16. Office International des Epizooties, (OIE). Caprine and ovine brucellosis. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, France, 2004.
 17. Ramírez-Pfeiffer, C., K. Nielsen, F. Marin-Ricalde, C. Rodríguez-Padilla y R. Gómez-Flores. Comparison of fluorescence polarization assay with card and complement fixation tests for the diagnosis of goat brucellosis in a high-prevalence area. Vet. Immunol. Immunopathol. 2006, 110:121-127.
 18. Schoonjans, F. Receiver operator characteristics (ROC) curve analysis. In: MedCalc Statistics for biomedical sciences, Software Manual. 2005, pp 113-121.
 19. Schwabe, C.W., Riemann, H. P. y Franti, C. E. Epidemiology in Veterinary Practice. Lea & Febiger. Philadelphia, USA, 1997, 303pp.

Recibido: 30 enero 2009
Aceptado: 10 de marzo 2009