

# IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DEL ANILLO EN LECHE Y ELISA INDIRECTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS EN REBAÑOS DOBLE PROPÓSITO DEL ESTADO LARA, VENEZUELA

## The Ring Test and Indirect Elisa for Brucella Detection in Milk on Dual Purpose Bovine Herds in the State of Lara, Venezuela

Jesús Maldonado<sup>1\*</sup>, Andrés Kowalski<sup>1</sup>, Manuel Milla<sup>2</sup>, Marielen Rodríguez<sup>1</sup> y Carmen Villasmil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Laboratorio de Embriología y Endocrinología Molecular, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Núcleo Tarabana. Cabudare, Venezuela. [jesusmaldonado@ucla.edu.ve](mailto:jesusmaldonado@ucla.edu.ve).

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Tecnología del Yaracuy. San Felipe, Venezuela.

### RESUMEN

El control eficiente de la brucelosis bovina requiere la detección oportuna de la enfermedad en los rebaños. Tradicionalmente, la Prueba del Anillo de Leche (PAL) o *Ring Test* se ha utilizado para realizar vigilancia epidemiológica de brucelosis a nivel de rebaños lecheros, no obstante, esta técnica presenta resultados variables dependiendo del número de animales que aportan leche a la muestra y presencia de leche de vacas con mastitis o de calostro en la muestra. Además, la PAL es una prueba subjetiva producto de la apreciación visual del analista. Como método alternativo se han desarrollado diversos estuches de ELISA indirecto (ELISAi) que permiten el diagnóstico de la brucelosis en muestras de leche. Los formatos de ELISAi muestran una gran sensibilidad y sus resultados son medidos por un espectrofotómetro, lo que disminuye el error de apreciación humano. En Venezuela, la mayor parte de la producción de leche se obtiene a partir de animales mestizos de doble propósito, generalmente criados bajo condiciones sanitarias deficientes y con gran variación en el número de animales que componen los rebaños, aunado a importantes tasas de mastitis y un escaso control del periodo de retiro del calostro. Se realizó un estudio para conocer el status de la brucelosis en el estado Lara, Venezuela, tomando 510 muestras de leche en 258 Unidades de Producción, para realizar PAL y ELISAi, encontrándose que el 27,25% eran No Negativas a la PAL y el 13,14% eran positivas a ELISAi. Ambas pruebas indican la presencia de la enfermedad en los predios analizados. Se observó una sensibilidad relativa de la prueba de la PAL al compararla con ELISAi del 56,72%, mientras que la especificidad

relativa alcanzó el 77,20%. La baja sensibilidad de PAL permite que ocurra un alto número de muestras falsas negativas, lo que conlleva a fallas del sistema de vigilancia epidemiológica.

**Palabras clave:** Brucelosis, prueba de anillo en leche, ELISA indirecto, sensibilidad relativa, especificidad relativa.

### ABSTRACT

The efficient control of the Bovine Brucellosis needs the opportune detection of the disease in the herds. Traditionally the Ring Test has served to realize epidemiological alertness of Brucellosis to level of dairy herds, nevertheless, this technology presents changeable behaviors depending on the number of animals that contribute milk sample and presence of milk of cows with mastitis or colostrum in the sample. In addition, the Ring Test is a subjective test, product of the visual appraisal of the analyst. As alternative method there have developed diverse kits of indirect ELISA (ELISAi) that allow the diagnosis of the Brucellosis in samples of milk. ELISAi's formats show a great sensibility and results are measured by a spectrophotometer, which diminishes the human mistake of appraisal. In Venezuela most of the milk production is obtained from half-caste animals of dual purpose, generally raised under sanitary deficient conditions and by great variation in the number of animals that compose the herds, united to important rates of mastitis and a scanty control the period of withdrawal of the colostrum. A study was realized to know the status of the Brucellosis in the Edo. Lara - Venezuela, taking 510 samples of milk in 258 Units of Production, to fulfil Ring test and ELISAi, thinking that 27.25% was Not Negative to the Ring Test and 13.14 were positive to ELISAi. Both tests indicate that in the analyzed

herds of the Lara State the disease exists. It was observed a relative sensibility of the Ring Test on having compared it with ELISAI of 56.72%, whereas the relative specificity reached 77.20%. This low sensibility carries in a high number of false negative samples, which is translated in faults of the epidemiological system of alertness.

**Key words:** Brucellosis, ring test, indirect ELISA, relative sensitivity, relative specificity.

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una patología de amplia distribución a nivel mundial y constituye un importante problema de salud pública [7, 13]. No obstante, en los países en vías de desarrollo es donde se registran las mayores tasas de prevalencia, constituyendo una de las principales zoonosis y ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería [7, 11, 13]. En este sentido, si bien es cierto que en Venezuela no se han estimado las pérdidas económicas producidas por la brucelosis, éstas han sido estimadas para toda Sudamérica en 270 millones de dólares al año. De estas pérdidas, el 47% corresponde a pérdidas en la producción de crías, 41% en producción de leche y 12% en costos de reposición de vientres [14].

En el país, la especie patógena más importante es *Brucella abortus* Biovar 1, que afecta fundamentalmente, tanto a los *Bos taurus*, como a los *B. indicus*, pero que también puede infectar a otros mamíferos susceptibles incluyendo al hombre [3]. En los bovinos, la patología cursa con tasas variables de aborto, retención placentaria e infertilidad en machos y hembras, así como una disminución en la producción láctea, además la brucelosis limita la movilización y comercialización del ganado, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores y el país [3, 6, 7, 10, 15].

Para lograr un control eficiente de la brucelosis bovina se requiere la eliminación de los animales positivos del rebaño, un adecuado programa de inmunización y un eficiente sistema de vigilancia epidemiológica en los rebaños [4, 11-13]. En este sentido, la Prueba del Anillo de Leche (PAL), comúnmente conocida como *Ring Test*, ha servido para realizar vigilancia epidemiológica de brucelosis a nivel de rebaños lecheros, no obstante, esta técnica presenta resultados variables dependiendo del número de animales que aportan leche a la muestra y presencia de leche de vacas con mastitis o de calostro en la muestra, razón por la cual la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) no recomienda su aplicación en predios pequeños o cuando la muestra provenga de más de 100 vacas [8, 11, 14], debido a lo anterior, que se han sometido a evaluación pruebas más sensibles para detectar bajos niveles de anticuerpos específicos. Además la PAL es una prueba subjetiva producto de la apreciación visual del analista [14].

Dentro de las pruebas más sensibles evaluadas, se han desarrollado diversos estuches de ELISA indirecto (ELISAI)

que permiten el diagnóstico de la brucelosis en muestras de leche. Algunos de estos formatos comerciales de ELISAI han sido validados y son usados ampliamente [11, 14, 17]. Los formatos de ELISAI muestran una gran sensibilidad, en este sentido, Vanzini y col. [17], reportan una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 88,1%. Por otro lado, como las lecturas de color son medidas en espectrofotómetros, se disminuye el error de apreciación humano [14].

Según Vargas [18], en los informes oficiales del programa de control y erradicación de la brucelosis en el periodo comprendido entre 1989-2001, los índices de positividad (IP) se ubicaron entre 0,67 y 1,15%. Estos indicadores ubicarían al país en un nivel bajo de la enfermedad, relativamente cercano al 0,2%, que según la OIE es el valor de prevalencia adecuado para declarar un área libre de la enfermedad. No obstante, algunos trabajos de investigación muestran evidencia experimental que contradice la información oficial; en este sentido, D' Pool y col. [4] demuestran que en el estado Zulia la tasa media de infección es de 9,1% utilizando la prueba de cELISA, así mismo, Contreras [3] reporta que se han obtenido resultados equiparables o más altos en otras regiones del país. Al analizar estos datos, Vargas [18], tomando en cuenta los resultados controversiales sobre el estatus real de la brucelosis en Venezuela, concluye que aún no se han realizado suficientes estudios para dilucidar esta problemática.

Por todo lo antes expuesto, en Venezuela se requiere un sistema de monitoreo de la enfermedad que resulte confiable, oportuno y económico, sobre todo, porque la mayor parte de la producción de leche se obtiene con animales mestizos de doble propósito, generalmente criados bajo condiciones sanitarias deficientes y con gran variación en el número de animales que componen los rebaños, aunado a importantes tasas de mastitis y un escaso control en el periodo de retiro del calostro. Por esta razón se realizó un estudio para conocer el estatus de la brucelosis en las muestras de leche de predios del estado Lara, y comparar el comportamiento de PAL y la prueba de ELISAI.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se realizaron las pruebas del Anillo de Leche (PAL) y ELISA indirecto (ELISAI) a 510 muestras de leche, colectadas en tubos de 50 mL con tapa de rosca y se almacenaron a + 5°C hasta su procesamiento. Las muestras provenían de 276 Unidades de Producción (UP) de doble propósito del estado Lara, y fueron colectadas entre los meses de abril- agosto del 2007.

El estado Lara está ubicado en el centro occidente de Venezuela, entre las coordenadas geográficas 09° 23' y 10° 45' de LN y entre los 68° 52' y 70° 58' de LO. Predominan dos tipos de clima: el tropical, seco y muy seco, y el premontano, también seco y muy seco, seguidos por el premontano húmedo. Las precipitaciones alcanzan 650 mm de promedio anual,

con lluvias que caen en épocas diferentes de acuerdo con el lugar. La temperatura media anual fluctúa entre 22 y 28°C, con un promedio de 23,8°C [5].

### Pruebas y reactivos empleados

Para la PAL se siguieron las recomendaciones establecidas por la OIE usando los antígenos fabricados por Fundagri-NIA, Maracay, Venezuela.

Las pruebas de ELISAI se realizaron con el estuche comercial BRUCELLOSE MILCH CHEKIT®Bommeli Diagnostic, Suiza, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las densidades ópticas de las muestras analizadas fueron registradas por un lector de ELISA  $\mu$ -Quant, BioTek, EUA, usando el Software KC Junior, BioTek, EUA. Las densidades ópticas registradas se sometieron a la prueba de validación sugerida por el fabricante, utilizando la hoja de cálculo Excel 2003.

### Análisis comparativo de pruebas diagnósticas

Se determinó la sensibilidad de la técnica de PAL en comparación con ELISAI, mediante la fórmula descrita por Malorny y col. [9]. El porcentaje de sensibilidad relativa  $SR = 100 \times (\text{concordancia de positivos con ELISAI y PAL}) / (\text{concordancia de positivos con ELISAI y PAL}) + (\text{falsos negativos por PAL})$ . El porcentaje de especificidad relativa  $ER = 100 \times (\text{concordancia de negativos con ELISAI y PAL}) / (\text{concordancia de negativos con ELISAI y PAL}) + (\text{falsos positivos por PAL})$ . Para representar los datos de estimación de la sensibilidad y especificidad de PAL se utilizó la tabla de contingencia descrita por Burkhard y col. [2]. Por conveniencia, se hace referencia a los cuadrantes de la matriz con dos signos y una letra, donde el primer signo corresponde a la prueba de referencia. El cuadrante (a) es [(+)(+)] y representa el número de muestras con concordancia positiva; el cuadrante (b) es [(-)(+)] y representa falsos negativos por PAL; el cuadrante (c) es [(+)(-)] y representa falsos positivos por PAL y el cuadrante (d) es [(-)(-)] y representa concordancia negativa entre las dos técnicas. Los cuadrantes (a) y (d) de la matriz representan el número de muestras donde hubo coincidencia positiva o negativa en los resultados. De este modo, la especificidad es la relación porcentual entre concordancias negativas y la sumatoria de la concordancia negativa y los falsos positivos  $[(d)/(d+c) \times 100]$ ,

también denominada predictibilidad negativa, que es el cociente de concordancia negativa y resultados negativos totales por prueba estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis comparativo de pruebas para el diagnóstico de brucelosis

De las 510 muestras de leche colectadas en 258 UP, para realizarle PAL y ELISAI, se encontró que 139 (27,25%) eran No Negativas a la PAL y 67 (13,14%) eran positivas a ELISAI (TABLA I).

Se registró concordancia positiva entre ELISAI y PAL en sólo 38 de las muestras analizadas, sin embargo 101 resultaron positivas a PAL y negativas a ELISAI (TABLA II). Por otro lado, 29 muestras fueron positivas a ELISAI y negativas a la PAL y 342 muestras fueron negativas en ambas técnicas (TABLA II). Como se explicó anteriormente, la SR es la relación porcentual de concordancia positiva entre muestras del cuadrante (a) y la sumatoria del cuadrante (a) y (b). Expresado de otra forma, la sensibilidad es un indicador de predictibilidad positiva (congruencia positiva/total de resultados positivos por prueba estándar)  $[(a)/(a+b)] \times 100$ . Así, la SR de la prueba de PAL (comparada con ELISA indirecto) resulta en un valor de 56,72%. Esto implica que asumiendo, como lo indica la literatura, que como la prueba de ELISAI es más sensible y específica que la PAL, ésta última sólo coincidiría en predicciones positivas en el 56,72% de los casos. Estos resultados concuerdan plenamente con la literatura revisada, de esta forma Rivera y col. [14], encontraron en un estudio similar, que la sensibilidad de la PAL era significativamente menor y concluyeron que la implementación del formato de ELISAI contribuiría más eficientemente al programa de vigilancia epidemiológica al superarse las fallas en sensibilidad y especificidad propias de la PAL.

Por otro lado, la ER de la prueba de PAL comparada con el ELISAI derivada de los datos presentados en la TABLA II, es del 77,20%. Este valor aceptable obedece a la concordancia negativa (342 muestras) que fueron detectadas como negativas por ambas técnicas. Esta situación también ha sido reportada previamente [8]

**TABLA I**  
**RESULTADOS POSITIVOS O NO NEGATIVOS Y NEGATIVOS DETECTADOS POR iELISA Y PAL EN 510 MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS / POSITIVE OR NOT NEGATIVE RESULTS AND NEGATIVES DETECTED BY iELISA AND PAL IN 510 MILK SAMPLES ANALYZED**

Resultado	Prueba	
	iELISA	PAL
Positivos	67 (13,14%)	139 (27,25%)
Negativos	443 (86,86%)	371 (72,75%)

**TABLA II**  
**TABLA DE CONTINGENCIA DE 2 COLUMNAS POR DOS RENGLONES PARA LA COMPARACIÓN DE ELISAI Y PAL EN 510 MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS / CONTINGENCY TABLE OF TWO RENGLONS AND TWO LINES FOR THE COMPARISON OF iELISA AND RING TEST IN 510 MILK SAMPLE ANALYZED**

	ELISA indirecto		
	PAL	Positivos	Negativos
Positivos		a (38)	c (101)
Negativos		b (29)	d (342)

En el mismo orden de ideas, Boraker y col. [1] reportaron que las falsas reacciones negativas de la prueba de aglutinación en leche, eran superadas al usar el formato de ELISAI. Adicionalmente, otros países de América han desarrollado estudios para comparar el comportamiento diagnóstico de ambas pruebas, este es el caso del SENASA de Argentina, que en su Resolución 79/2003 adopta la técnica de ELISAI en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina en establecimientos lecheros, con los alcances propios de las pruebas de vigilancia epidemiológica, argumentando que la incorporación de la técnica de ELISAI en leche total del rebaño lechero, significará una mejora en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico aplicado a la vigilancia epidemiológica [16].

Por último, la técnica de ELISAI permite superar las apreciaciones subjetivas propias de la PAL, aumentando significativamente el número de muestras analizadas por hora/hombre y de esta manera reduciendo los costos del programa de vigilancia [14].

## CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, se puede observar que el formato de ELISAI representa una herramienta valiosa para el control de la brucelosis, al permitir una detección más rápida y precisa de anticuerpos contra *Brucella* en muestras de leche de rebaños de doble propósito, criados bajo condiciones sanitarias y de manejo precarias. En este sentido la implementación de ELISAI para el monitoreo de la brucelosis constituye una herramienta diagnóstica más sensible y específica que la PAL, contribuyendo a que el programa de control y erradicación de Brucelosis se vería favorecido al disminuir los costos globales de la vigilancia y enfocar los esfuerzos sanitarios en las UP con problemas de brucelosis determinados de manera precisa y oportuna. Adicionalmente, como lo recomienda la OIE, la PAL pudiese emplearse como una metodología alternativa cuando el formato de unión primaria no esté disponible.

## AGRADECIMIENTO

Al Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria por la colaboración, oportunas sugerencias y asesorías prestadas.

Al Programa Integral de Desarrollo Lechero del estado Lara (PIDEL) por el financiamiento de los ensayos.

A los productores adscritos al PIDEL por el apoyo y la confianza recibida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BORAKER, D.; STINEBRING, W.; KUNKEL, J. Enzyme-Antibody Immunoassay for Detection of *Brucella abortus* Antibodies in Milk: Correlation with the *Brucella*

Ring Test and with Shedding of Viable Organisms. **J. of Clin. Microbiol.** 14 (4): 396-403. 1981.

- [2] Burkhard, M.; Joorfar, J.; Bunge, C.; Helmuth, R. Multi-center Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. **Applied and Environm. Microbiol.** 69: 290-296. 2002.
- [3] CONTRERAS, J. Brucelosis. En: **Enfermedades de los Bovinos, Diagnóstico, Tratamiento y Control.** 2<sup>da</sup> Ed. Barquisimeto. 497-506 pp. 2000.
- [4] D' POOL, G.; RIVERA, S.; TORRES, T.; PÉREZ, M.; GARCÍA, A.; CASTEJÓN, O.; ROJAS, N. Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el municipio la cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIV (2): 168-176. 2004.
- [5] FUDECO. Relieve, topografía y clima del estado Lara 2009. Ministerio del poder Popular para la Planificación y el Desarrollo de la República Bolivariana de Venezuela. En línea: <http://www.fudeco.gob.ve/>. 15/09/2009.
- [6] GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA. Normas para el programa de prevención, control y erradicación de la brucelosis. **Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela.** Resolución N° 127. 2003.
- [7] GALL, D.; COLLING, A.; MARINO, O.; MORENO, E.; NIELSEN, K.; PÉREZ, B.; SAMARTINO, L. Enzyme Immunoassays for Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis: A Trial in Latin America. **Clin. and Diag. Lab. Immunol.** 5: 654-661. 1998.
- [8] LÓPEZ, J.; BEST, A.; MORALES, C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). **Arch. de Med. Vet.** 30 (1): 863-866. 1998.
- [9] MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of *Salmonella* specific PCR-based method. **Internat. J. of Food Microbiol.** 89: 241-249. 2003.
- [10] NIELSEN, K. Diagnosis of Brucellosis by Serology. **Vet. Microbiol.** 90: 447-459. 2002.
- [11] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZZOOTIES. Bovine Brucellosis. **OIE Terrestrial Manual 2009.** Chapter 2.4.3, 6<sup>th</sup> Ed., Paris. Vol. II. 1-2, 15-16, 20-21 pp. 2009.
- [12] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Brucellosis. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales.** Publicación Científica y Técnica N° 580, 3ra Ed., Washington. Vol. 1. 28-56 pp. 2001.
- [13] RADOSTITS, O.; GAY, C.; BLOOD, D.; HINCHELIF, K. Brucellosis. **Medicina Veterinaria.** McGraw-Hill Interamericana, 9<sup>na</sup> Ed., Madrid. Vol 1. 1025-1042 pp. 1999.

- [14] RIVERA D.; RUEDA, O.; CALDERON, C.; MARIÑO, O.; GALL, D.; NIELSEN, K. Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia. **Rev. Scientif. et tech. OIE.** 22 (3): 1065-1075. 2003.
- [15] SAMARTINO, L. Brucellosis in Argentina. **Vet. Microbiol.** 90: 71-80. 2002.
- [16] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, ganadería, Pesca y Alimentos. Ministerios de Economía y Producción de la República Argentina. Resolución 79/2003. En línea: <http://www.se-nasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1033&io=4536>. 05/01/2009.
- [17] VANZINI, V.; AGUIRRE, N.; VALENTINI, V.; TORIONI, S.; LUGARESI, C.; MARCHESIMO, M.; NIELSEN, K. Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to Brucella abortus in bulk milk samples. **Vet. Microbiol.** 82 (1): 55-60. 2001.
- [18] VARGAS, F. Situación epidemiológica de la brucelosis en Venezuela. **Gac. de Cien. Vet. DCV-UCLA.** 8: 69-79. 2003.