COMPARACION DE LA EFICACIA DE DOS PRUEBAS ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS OVINA.

Mª Jesús de Miguel, Jose Mª Blasco, Clara Mª Marín
Unidad de Sanidad Animal. S. I. A./ D.G.A. Apartado 727. 50.080 Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico oficial de la brucelosis ovina por *B. melitensis* se realiza mediante las pruebas serógicas de Rosa Bengala (RB) y Fijación del Complemento (FC). Estas pruebas no detectan la totalidad de animales infectados, son complicadas de realizar a gran escala y presentan problemas de falta de especificidad para la diferenciación de animales vacunados con Rev 1 [1, 2]. La prueba de Doble difusión en gel con Hapteno Nativo (DDG-HN) es la prueba más especifica para diferenciar ovinos vacunados de los infectados [3] pero no es una prueba oficial. Los enzimoinmunoensayos (ELISA) están siendo ya considerados como pruebas oficiales por la Unión Europea para el diagnóstico de la brucelosis, pese a que no existen demasiados estudios acerca de su sensibilidad y especificidad en ganado ovino. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad y especificidad del test ELISA indirecto desarrollado y comercializado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (ELISA-AIEA) con otro test indirecto puesto a punto en nuestro laboratorio (ELISA- Prt.G), en comparación con las pruebas RB, FC y DDG, en ovejas infectadas por *B. melitensis* y en animales vacunados en distintas condiciones con la vacuna viva Rev 1 de *B. melitensis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los sueros analizados fueron:
- 140 sueros de ovejas con infección natural por *B. melitensis* (83 con *B. melitensis* biovar 1 y 58 con la biovariedad 3). La infección bacteriológica se demostró mediante aislamiento en cultivo de muestras tras la necropsia de los animales.
- 121 sueros de ovejas libres de brucelosis y no vacunadas.
- 351 sueros de animales libres de brucelosis y vacunados con la dosis estándar de *B. melitensis* Rev 1 (10^9 de organismos viables) a los 3-4 meses de edad o a los 14 meses de edad, por vía subcutánea o conjuntival, y tomados a distintos intervalos tras la vacunación (ver tabla 2).

Las pruebas de RB y FC se realizaron en la forma descrita por Alton y col. [4] con la modificación para el diagnóstico en ovejas descrita por Blasco y col. [5]. La prueba de DDG (DDG-NH y DDG-LPS-S) se realizó según el procedimiento descrito por Marín y col. [3]. El ELISA-Prt.G se llevó a cabo según la técnica descrita por Alonso Urmeneta y col.[6]. El ELISA–AIEA se llevo a cabo según los procedimientos del kit comercial suministrado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA, Viena, Austria). Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas se calcularon con respecto a los grupos de animales infectados y libres de *Brucella* de la forma descrita por Jones y col. [7]. La sensibilidad óptima en las técnicas ELISA se determinó mediante análisis ROC (Receiver-Operating-Characteristic) con el paquete estadístico SAS (SAS Instutute Inc). La comparación de las pruebas se realizó con una t de Student con Microsoft Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a la comparación de los tests ELISA, un suero fue considerado positivo, únicamente cuando en los dos análisis repetidos presentaba una D.O. superior al 20 % del control en el ELISA-Proteína G y superior al 10% del control en el ELISA-

Los resultados de sensibilidad y especificidad de las distintas pruebas diagnósticas analizadas con los sueros control se presentan en la Tabla 1. Todas las pruebas resultaron 100 % específicas con los sueros de animales libres de brucelosis. El ELISA-Prt G resultó más sensible (99,57%) que el ELISA-IAEA (93,57%) ($p<0,01$) y la DDG-NH resultó ser la prueba menos sensible (74,29%) ($p<0,001$ frente al RB, FC y los dos ELISA). Los resultados de especificidad de las pruebas analizadas con los sueros de animales vacunados se presentan en la Tabla 2. La especificidad de todas las pruebas serológicas aumenta cuando la vacunación se realiza por vía conjuntival, sobre todo, en animales jóvenes. Como ya hemos confirmado en otros estudios similares (3) la DDG-NH resultó ser la prueba más específica. La explicación podría estar en que esta técnica detecta preferentemente anticuerpos de alta afinidad característicos de las infecciones activas (3). Pese a su menor sensibilidad, esta cualidad debería ser tenida en cuenta en determinadas situaciones epidemiológicas. Los datos de especificidad de las dos pruebas ELISA comparadas resultaron muy discordantes. Ello es debido a las diferentes estandarizaciones de los dos tests, que hacen que la mayoría de los sueros que resultaron negativos en el kit ELISA-AIEA, fueron positivos en nuestro ELISA-Prt G a una Densidad Optica muy baja, situada entre el 20-30% de la del suero control. El test ELISA-AIEA es un Kit desarrollado para ganado vacuno, con antígeno obtenido de *B. abortus*, y en el que se utiliza como conjugado un policlonal anti-IgG bovina. Por contra, el ELISA-Prt G usa un antígeno obtenido en *B. melitensis* y un conjugado con Proteína G. Las diferencias en la estandarización, mejor que las diferencias entre antígenos y conjugados mencionadas, podrían explicar la mejor sensibilidad de la técnica ELISA-Prt G para el diagnóstico de *B. melitensis* en ovino. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en ensayos similares [6, 8].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blasco, J.M., *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, 1994. 32(8): p. 1835-1840.
2. Jimenez-de-Bagüés, M.P., *et al.*, Veterinary Microbiology, 1992. 30: p. 2-3.
3. Marín, C.M., *et al.*,. Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology, 1999. 6(2): p. 269-272.
4. Alton, G.G., *et al.*, *Techniques for the Brucellosis Laboratory*, ed. P. INRA, France. 1988:147, rue de l'Université, 75007 Paris. 190.
5. Blasco, J.M., *et al.*,. Veterinary Record, 1994. 134(16): p. 415-420.
6. Alonso-Urmeneta, B., *et al.*,. Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology, 1998. 5(6): p. 749-754.
7. Jones, L.M. and e. al.,. Journal of Clinical Microbiology, 1980. 12(6): p. 753-760.
8. Marín, C.M., *et al.*,. Veterinary Record, 1998. 143(14): p. 390-394.

Tabla 1: Resultados de sensibilidad y especificidad de las pruebas RB, FC, DDG-HN, DDG-LPS-S, ELISA-Prt G y ELISA-AIEA en 140 ovejas con infección natural por *B. melitensis* y 121 ovejas libres de brucelosis.

	Pruebas					
	RB	FC	DDG-NH	DDG-LPS-S	ELISA-Prt G	ELISA-AIEA
Sensibilidad	92,14	88,57	74,29	84,29	99,28	93,57
Especificidad	100	100	100	100	100	100

Tabla 2: Especificidad de las pruebas RB, FC, DDG-HN, DDG-LPS-S, ELISA-Prt G y ELISA-AIEA para el diagnóstico de brucelosis con sueros de ovejas vacunadas con Rev 1

				Pruebas					
Edad de la vacunación	Vía de la vacunación	Semanas tras la vacunación	Número de animales analizados	RB	FC	DDG - HN	DDG - LPS-S	ELISA -Prt G	ELISA - AIEA
3 meses	Subcutánea	4	11	0	0	0	0	0	81,8
		7	21	0	9,5	52,4	0	0	76,2
		16	20	25	60	95	0	0	20
		19	11	0	76,2	100	0	0	45,5
		25	21	38,1	76,2	100	28,6	9,5	38,1
	Conjuntival	3	25	8	68	100	24	8	92
		4	11	18,2	36,4	100	54,5	9,1	100
		8	24	25	87,5	100	55	20,9	87,5
		16	25	88	100	100	96	56	36
		25	11	90,9	100	100	100	90,9	100
14 meses	Subcutánea	4	30	0	6,7	70	0	0	64
		17,5	29	17,2	55,2	86,8	20,7	0	41,4
		21,5	28	14,7	39,3	89,7	50	0	60,7
	Conjuntival	4	28	0	0	100	14,3	0	71,4
		17,5	28	64,3	67,9	92,9	82,2	25	50
		21,5	28	67,9	71,4	100	75	21,4	60,7

* Especificidad expresada como porcentaje de negativos