

Estudio comparativo de las pruebas de Rosa de Bengala y Elisa competitivo para el diagnóstico de brucelosis en rebaños doble propósito del estado Lara, Venezuela

Jesús Maldonado¹, Andrés Kowalski¹, Manuel Milla², Omar Verde³,
Jesús Alvarado¹, Alexi Rodríguez¹, Carmen Villasmil¹, Germán Portillo⁴

¹Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Laboratorio de Diagnóstico Molecular – Laboratorio de Embriología y Endocrinología Molecular, Núcleo Tarabana, Cabudare, estado Lara, Venezuela.

² Instituto Universitario de Tecnología del Yaracuy, San Felipe, estado Yaracuy, Venezuela.

³ Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial, San Felipe, estado Yaracuy, Venezuela.

⁴ Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Correo electrónico: jesusmaldonado@ucla.edu.ve

RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis que afecta negativamente los rebaños lecheros en América Latina. El hombre, fundamentalmente se infecta con la bacteria *Brucella abortus* por la ingesta de productos lácteos no pasteurizados. En Venezuela la mayor parte de la producción láctea se obtiene con animales mestizos doble propósito, generalmente criados bajo condiciones sanitarias deficientes. Una fracción importante de esta leche es trasformada en quesos frescos para la alimentación humana. En el país la prueba tamiz oficial es la de Rosa de Bengala (RBT), mientras que el ELISA competitivo (cELISA) se considera como prueba confirmatoria definitiva. Se realizó un estudio para conocer el estatus de la Brucelosis en el estado Lara–Venezuela, donde inicialmente se hicieron pruebas del Anillo de Leche (PAL) a 276 Unidades de Producción (UP), encontrándose que el 30% eran positivas. Posteriormente, se sometieron sueros sanguíneos de 13.351 bovinos de ambos sexos y de todos los grupos etáreos mayores de seis meses, de 83 UP positivas a la PAL, a las técnicas de RBT y cELISA. El índice de positividad fue de 0,51% con RBT y 7,33% con cELISA. Ambas pruebas indican que el estado Lara tiene bajo índice de positividad. Sin embargo, la sensibilidad relativa de la prueba de RBT resultó muy baja (6,44%), al compararla con la obtenida por cELISA. Esta baja sensibilidad se traduce en un alto número de falsos negativos que no son eliminados de los rebaños y que constituyen una fuente constante de infección para los otros animales y el hombre.

Palabras clave: Brucelosis, Zoonosis, Rosa de Bengala, ELISA competitivo, índice de positividad, sensibilidad relativa.

Comparative study of rose bengal and competitive elisa tests for brucellosis in dual purpose herds in Lara State, Venezuela

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic disease that negatively affects milk production in Latin America. Infections with *Brucella abortus* bacteria observed in human populations are fundamentally caused by ingestion of non-pasteurized milk by-products. In Venezuela, most of the milk production is obtained from crossbred dual purpose herds, which are generally under deficient sanitary conditions. A significant amount of milk produced is used for production of non-pasteurized cheese for human consumption. In Venezuela, the official screening test for brucellosis is Rose Bengal test (RBT), leaving competitive ELISA test (cELISA) to only definitively confirm results obtained from

RBT. A trial was performed to assess the status of brucellosis in Lara state, Venezuela. Initially, milk ring tests were performed in 276 farms, with 30% of them testing positive. Serum samples were collected from all animals of farms that tested positive to ring test. A total of 13.351 serum samples were collected and tested with both RBT and cELISA assays. Positive index observed with RBT was lower when compared to cELISA (0.51% vs 7.33%, respectively). Furthermore, both tests confirm that positive index in Lara state is very low. However, relative sensitivity observed in RBT is very low when compared to cELISA (6.44%). This low sensitivity could result in a high number of false negative animals that, consequently, will not be eliminated from the herds. Thus, this would constitute a constant source of infection to other animals and people.

Key words: Brucellosis, Zoonotic disease, Rose Bengal Test, competitive ELISA, positive index, relative sensitivity.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una patología de amplia distribución a nivel mundial que constituye un importante problema de salud pública, con altas tasas de prevalencia en muchos países tropicales, constituyendo una de las principales zoonosis y provocando cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería (Contreras, 2009; D' Pool *et al.*, 2004; Radostits *et al.*, 1999). En Venezuela, la especie más importante es *Brucella abortus* Biovar 1, que afecta fundamentalmente al bovino, pero que también puede infectar a otros mamíferos susceptibles incluyendo al hombre (D' Pool *et al.*, 2004). La patología cursa con tasas variables de aborto, retención placentaria e infertilidad, así como 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 (D' Pool *et al.*, 2004; Nielsen, 2002; OIE, 2000).

Como parte integral en los programas de control y erradicación de esta enfermedad, el diagnóstico de la brucelosis debería ser realizado mediante un método específico, sensible y que detecte todas las fases de la infección. No obstante, una metodología que cumpla con todos los requisitos aún no está disponible (OPS, 2001), aunque actualmente existen opciones diagnósticas que pueden optimizar el manejo de la enfermedad. Está demostrado que las pruebas de aglutinación (Card test, Rápida en Placa, Prueba Lenta en Tubo) son inferiores a las pruebas inmunoenzimáticas (Contreras, 2009; Mc Guiven *et al.*, 2003; Nielsen, 2002; OIE, 2000; Radostits *et al.*, 1999).

En Venezuela la campaña de control y erradicación de la brucelosis bovina está normada en la Resolución 127 del MAT del 2003. Según ésta, el diagnóstico de campo se realiza por medio de la prueba de

Rosa de Bengala (RBT), quedando como pruebas confirmatorias definitivas: el cELISA, Aglutinación Lenta en Tubo (LT), 2 – Mercaptoetanol (2-M) y FC.

A pesar que la prueba de cELISA en Venezuela está legalmente contemplada como confirmatoria definitiva, aún no se ha reportado ningún estudio para determinar el punto de corte a partir de muestras locales, sobre todo asumiendo que en Venezuela no existe ningún área oficialmente libre de brucelosis. Al respecto Greiner *et al.* (1994), reportan que en el serodiagnóstico de enfermedades infecciosas en países tropicales, los puntos de corte usados son generalmente establecidos en base a sueros obtenidos de animales de países de clima templado, e indican que con el uso de análisis de "Cluster" la data obtenida bajo condiciones tropicales puede ser agrupada de tal manera que permita una estimación de la seroprevalencia cuando los sueros de control negativo no estén disponibles.

Entre tanto, Vargas (2003), menciona que en los informes del programa de control y erradicación de la brucelosis en el periodo 1989 – 2001 los índices de positividad (IP) se ubicaron entre 0,67 y 1,15%. No obstante, algunos trabajos de investigación muestran evidencia experimental que ameritan una revisión más profunda. En este sentido, D' Pool *et al.* (2004), encontraron en el estado Zulia una tasa media de infección de 9,1% utilizando la prueba de cELISA, así mismo Contreras (2009), reseña que otros investigadores han obtenido resultados equiparables o más altos en otras regiones del país. Al analizar estos datos Vargas (2003), tomando en cuenta todos los resultados sobre el estatus real de la brucelosis en Venezuela, concluye que aún no se han realizado suficientes estudios para dilucidar esta problemática.

Para contribuir al conocimiento de esta importante zoonosis, se realizó un estudio con el fin de conocer

el estatus de la brucelosis bovina en el estado Lara, al comparar el comportamiento de RBT y la prueba de cELISA, asumiendo un punto de corte basado en datos obtenidos a partir de sueros locales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y localidades

Se realizó la prueba del Anillo de Leche (PAL) a rebaños de ganadería bovina doble propósito de 276 Unidades de Producción (UP) del estado Lara. En base a los resultados de la prueba PAL (UP positivas en leche) se tomaron muestras de sangre completa en tubos al vacío sin anticoagulante (Vacutainer®) con agujas desechables (Vacutainer®) a un total de 13.351 bovinos con edades superiores a 6 meses en 83 UP ubicadas en los municipios Andrés Eloy Blanco, Creso, Iribarren, Jiménez, Morán, Simón Planas, Torres y Urdaneta del estado Lara, entre los meses de agosto 2006 y agosto del 2007. Los sueros de las muestras colectadas fueron alicuotados en tubos de 2 mL con tapa de rosca y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Pruebas y reactivos empleados

Para las pruebas de RBT y PAL se siguieron las recomendaciones establecidas por la OIE usando los antígenos fabricados por la Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología Agrícola del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (FUNDAGRI – INIA), Maracay, Venezuela.

Las pruebas de cELISA se realizaron con un estuche comercial (*Brucella-AB C-ELISA SVANOVIR*® Svanova Veterinary Diagnostics, Uppsala, Suecia), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las Densidades Ópticas de las muestras analizadas fueron registradas por un lector de ELISA (*μQuant*™ *Microplate Spectrophotometer*, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) usando el Software KC Junior (*KCJunior*™ *Data Analysis Software*, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Los Porcentajes de Inhibición (% I) fueron calculados en la hoja de cálculo Excel 2003.

Análisis estadístico para la determinación del punto de corte utilizando los datos obtenidos durante el estudio

Se siguió la metodología recomendada por la OIE (2006), para establecer los principios de validación de

ensayos diagnósticos para enfermedades infecciosas. Al respecto, como se utilizó un estuche comercial previamente validado bajo otras condiciones y aceptado por la OIE como una alternativa para el diagnóstico de esta enfermedad, el proceso de validación se centró en la determinación de sensibilidad y especificidad analítica del estuche bajo las condiciones del estudio. En este sentido, se siguió el procedimiento establecido para una población animal con estatus desconocido. Así, del total de observaciones del % I se seleccionaron dos grupos (N° 1 y N° 2), utilizando como técnica el análisis de *cluster*, el cual tiene como idea básica agrupar un conjunto de observaciones en un número dado de grupos y este agrupamiento se basa en criterios de distancia o similitud entre las observaciones (Everit, 1995). A estos grupos se les determinó un intervalo de confianza del 95% y con el propósito de minimizar el efecto de los valores extremos en la media, se procedió a eliminar las observaciones por debajo del primer cuartil del grupo N° 1 y las observaciones superiores al tercer cuartil del grupo N° 2 y se repitió el procedimiento antes mencionado (Olsen *et al.*, 1996). Luego, se escogieron las observaciones comprendidas entre el tercer cuartil del grupo N°1 y el primer cuartil del grupo N° 2 y se calculó la media, desviación y el correspondiente intervalo de confianza, obteniendo así un referencial adecuado como umbral de corte. Los datos fueron procesados utilizando el Statistical Software Minitab for Windows, versión 14, realizándose el análisis multivariado de cluster, el cálculo de los estadísticos descriptivos y la determinación de los intervalos de confianza.

Con la data obtenida, se procedió a construir una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic* por sus siglas en inglés) y a calcular valores de sensibilidad y especificidad utilizando el software MatLab, versión 7.0 (*MATLAB*®.The MathWorks, Inc., Natick, Massachussets, USA). Aplicando los procedimientos señalados se obtienen estimaciones de los verdaderos valores de sensibilidad y especificidad para una población teórica, de la que se asume que el grupo de muestras estudiado constituye una muestra aleatoria. Por tanto, un tratamiento estadístico correcto de cantidades como las calculadas por estos métodos exigió incluir medidas de su precisión como estimadores y, mejor aún, utilizarlas para construir intervalos de confianza para los verdaderos valores de sensibilidad y especificidad.

Análisis comparativo de pruebas diagnósticas

Se determinó la sensibilidad de la técnica de RBT en comparación con cELISA mediante la fórmula descrita por Malorny *et al.* (2003). El porcentaje de sensibilidad relativa $SR = 100 \times (\text{concordancia de positivos con la prueba de referencia internacional cELISA y RBT}) / (\text{concordancia de positivos con la prueba de referencia internacional cELISA y RBT}) + (\text{falsos negativos por RBT})$. El porcentaje de especificidad relativa $ER = 100 \times (\text{concordancia de negativos con la prueba de referencia internacional cELISA y RBT}) / (\text{concordancia de negativos con la prueba de referencia internacional cELISA y RBT}) + (\text{falsos positivos por RBT})$. Para representar los datos de estimación de la sensibilidad y especificidad de RBT se utilizó la tabla de contingencia descrita por Burkhard *et al.* (2002). Por conveniencia, se representan 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 RBT; el cuadrante (c) es [(+)(-)] y representa falsos positivos por RBT 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 estadístico para la determinación del punto de corte para cELISA utilizando los datos obtenidos durante el estudio

Como en este caso particular no existían sueros de referencia con el verdadero estatus de la enfermedad, ni se dispone en Venezuela de “Áreas Libres de Brucelosis”, se utilizó el modelo establecido en caso de ausencia de prueba de oro o *Gold Standard* (Greiner *et al.*, 1994; OIE 2006). De esta manera, las 13.306 observaciones de % I fueron asignadas a dos grupos (N° 1 y N° 2), siguiendo lo establecido para un análisis de *cluster*. A estos dos grupos se les calculó un intervalo de confianza de 95% obteniéndose los resultados que se presentan en las Figuras 1 y 2 y en la Cuadro 1.

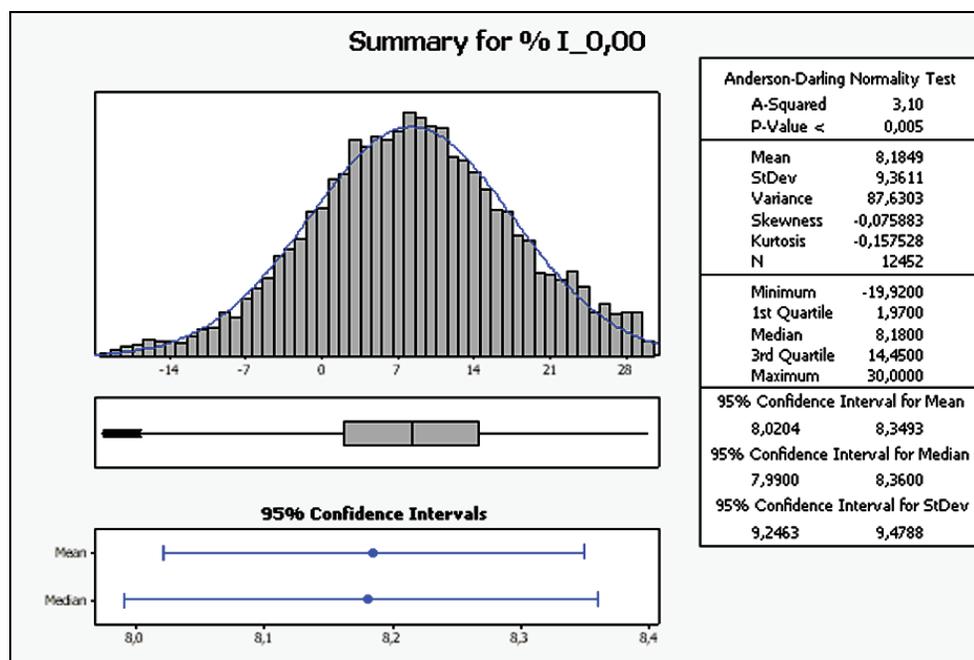


Figura 1. Intervalos de confianza del 95% para el grupo 1, generados a partir del total de observaciones (13.306 observaciones).

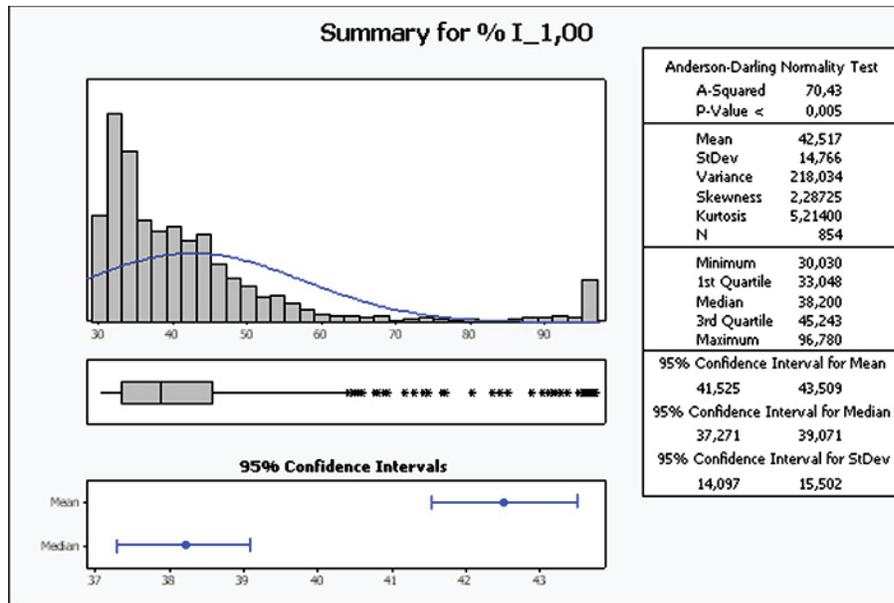


Figura 2. Intervalos de confianza del 95% para el grupo 2, generados a partir del total de observaciones (13.306 observaciones).

Cuadro 1. Intervalos de confianza del 95% para los grupos 1 y 2, generados a partir del total de observaciones (13.306 observaciones).

Grupo	N	Media	Desviación	Límite inferior (L_i)	Límite superior (L_s)
1	12452	8.1849	9.3611	8.0204	8.3493
2	854	42.517	14.766	41.525	43.509

Debido a que la media, como medida de tendencia central, es afectada por la presencia de valores extremos, se procedió a eliminar de la matriz de información las observaciones por debajo del primer cuartil del grupo N° 1 y las observaciones superiores al tercer cuartil del grupo N° 2. En este sentido, se trabajó con 11.107 observaciones, de las cuales nuevamente se generaron dos grupos utilizando el análisis de *cluster* antes mencionado y se les determinó un intervalo de confianza de 95%, arrojando los siguientes resultados (Figuras 3 - 4 y la Cuadro 2).

Es conveniente resaltar que estos grupos obtenidos presentan menor variabilidad que los anteriores y que entre el tercer cuartil del grupo N° 1 y el primer cuartil del grupo N° 2 se encuentran 457 observaciones,

las cuales al ser procesadas dieron los resultados observados en la Figura 5 y la Cuadro 3.

Este grupo posee, de acuerdo a la prueba de Anderson-Darling, ($A\text{-Squared} = 35.34$; $P\text{-Value} < 0.005$), una distribución tendiente a la normal con una media de 29.738 que es aproximadamente igual a la mediana de 29.850, aspecto que conduce a pensar que el valor de $29.738 \approx 28 - 30$ es una buena referencia como umbral o punto de corte.

Con los datos obtenidos a partir del análisis de *cluster* se realizó una curva ROC (Figura 6).

En la curva, cada punto corresponde a un par de valores teóricos de sensibilidad y el complemento de especificidad para un respectivo valor de punto de corte.

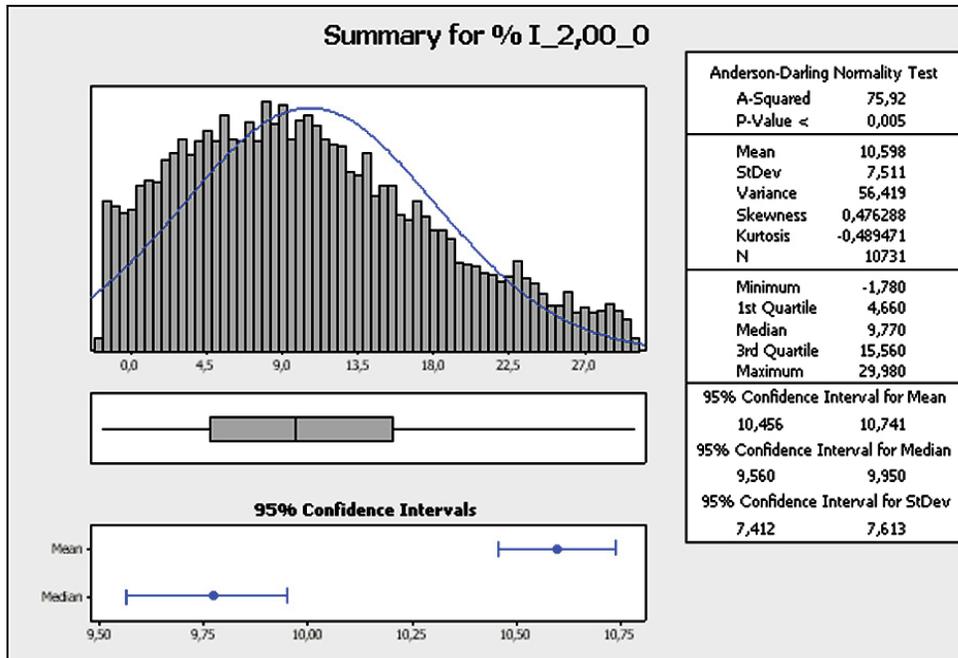


Figura 3. Intervalos de confianza del 95% para el grupo 1, generado a partir de las observaciones por debajo del primer cuartil del grupo N° 1 y las observaciones superiores al tercer cuartil del grupo N° 2 (11.107 observaciones).

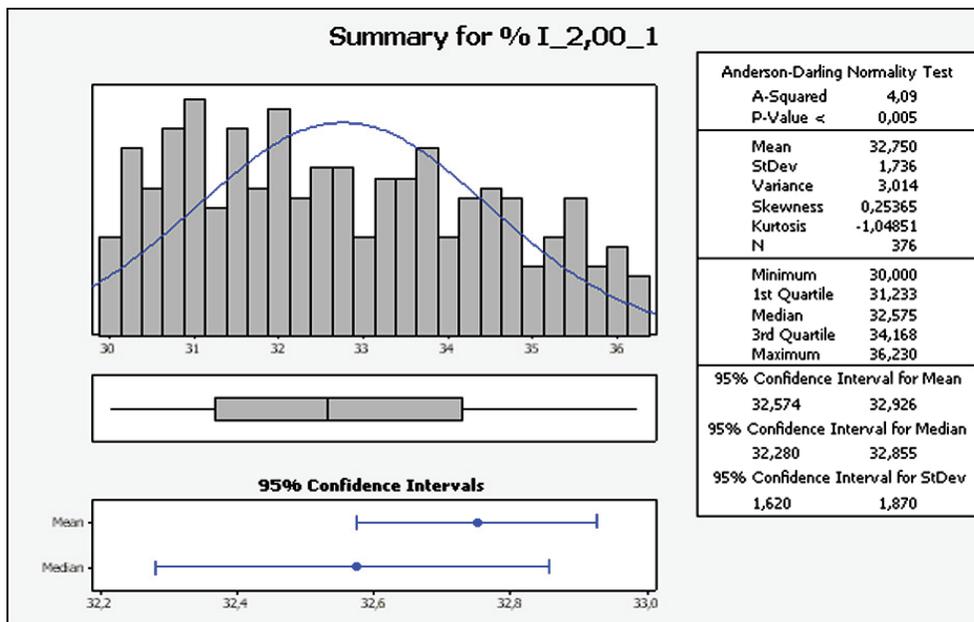


Figura 4. Intervalos de confianza del 95 % para el grupo 2, generado a partir de las observaciones superiores al primer cuartil del grupo N° 1 y las observaciones inferiores al tercer cuartil del grupo N° 2 (11.107 observaciones).

Cuadro 2. Intervalos de confianza del 95% para los grupos generados a partir de las observaciones superiores al primer cuartil del grupo N° 1 y las observaciones inferiores al tercer cuartil del grupo N° 2 (11.107 observaciones).

Grupo	N	Media	Desviación	Límite inferior (L_i)	Límite superior (L_s)
1	10731	10.598	7.511	10.456	10.741
2	376	32.750	1.736	32.574	32.956

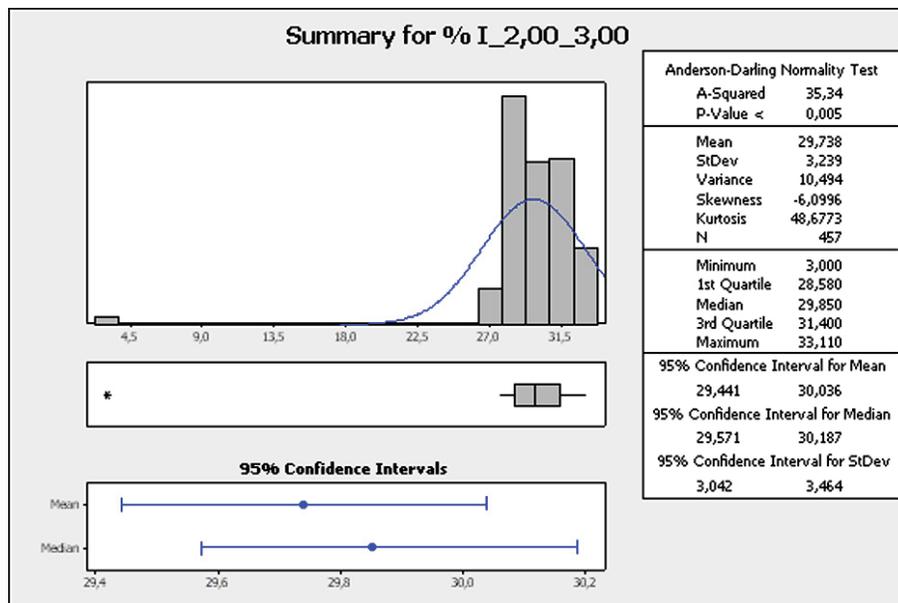


Figura 5. Intervalo de confianza del 95% para el grupo comprendido entre el tercer cuartil del grupo N° 1 y el primer cuartil del grupo N° 2 (457 observaciones).

Cuadro 3. Intervalo de confianza del 95% para el grupo comprendido entre el tercer cuartil del grupo N° 1 y el primer cuartil del grupo N° 2 (457 observaciones).

Grupo	N	Media	Desviación	Límite inferior (L_i)	Límite superior (L_s)
1	457	29.738	3.329	29.441	30.036

El punto de corte se barrió en un rango de -100 a 100 y por cada punto se evaluó la función de distribución acumulativa de dos poblaciones teóricas normales con los valores de media y desviación estándar indicados en la Cuadro 2. Como se puede observar en la Figura 6, los puntos correspondientes a los distintos valores de punto de corte (20, 25, 30, 35 y 40% de Inhibición), muestran una disminución de la sensibilidad y especificidad a medida que se incrementa el valor del punto de corte. A medida que disminuye el valor del punto de corte se pierde especificidad, aunque la sensibilidad se mantiene con muy poca variación. Los resultados de la curva ROC (Figura 6) obtenida a partir de la data agrupada por el análisis de *cluster*, muestran que un valor de 30% de Inhibición es un buen Punto de Corte para la data analizada con una Sensibilidad de 96, 34% y una especificidad de 99, 51%.

Análisis comparativo de pruebas para el diagnóstico de brucelosis.

La PAL fue realizada en 276 UP del estado Lara, de los cuales el 30%, es decir, 83 resultaron positivas

y por lo tanto se procedió a tomar 13.351 muestras de suero de todos los bovinos mayores de cuatro meses encontrados en 119 UP que presentaron esta condición. Del total de muestras analizadas, 979 fueron positivas por cELISA (Punto de corte 28,6%), mientras que sólo 68 reaccionaron a la prueba de RBT. De esta manera, la prueba de RBT permitió detectar un 0,51% de muestras positivas a diferencia de cELISA que detectó un 7,33% (Cuadro 4).

De esta manera, existió concordancia positiva en sólo 63 muestras entre cELISA y RBT; sin embargo, 916 resultaron positivas a cELISA y negativas a RBT (Tabla 2). Por otro lado, cinco muestras fueron positivas a RBT y negativas a cELISA y 12.367 muestras fueron negativas en ambas técnicas (Cuadro 5). 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) $[(a)/(a+b)] \times 100$. De este modo, la SR de

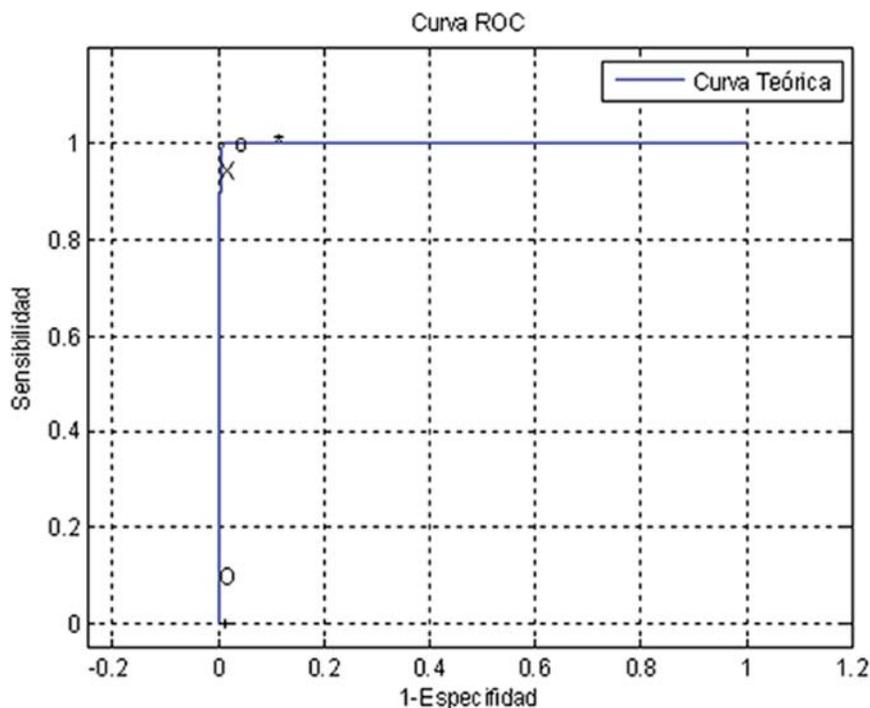


Figura 6. Curva ROC teórica basada en el análisis de cluster, tomando en cuenta diferentes valores de inhibición correspondientes a cinco puntos de corte teóricos. *punto de corte = 20% de inhibición, opunto de corte = 25% de inhibición, xpunto de corte = 30% de inhibición, opunto de corte = 35% de inhibición, +punto de corte = 40% de inhibición.

Cuadro 4. Resultados positivos o reactivos y negativos detectados por cELISA y RBT en 13.352 muestras de suero analizadas en bovinos.

Resultado	Prueba	
	cELISA	RBT
Positivos	979 (7,33%)	68 (0,51%)
Negativos	12.373 (92,67%)	13.283 (99,49%)

Cuadro 5. Contingencia de regulación de 2 columnas por dos renglones para la comparación de cELISA y RBT en suero de bovinos.

RBT	cELISA	
	Positivos	Negativos
Positivos	a (63)	c (5)
Negativos	b (916)	d (12.367)

a: Positivo cELISA y Positivo RBT. b: Positivo cELISA y Negativo RBT. c: Negativo cELISA y Positivo RBT. d: Negativo cELISA y Negativo RBT.

la prueba de RBT (comparada con cELISA) resulta en un valor de 6,91%. Esto implica que, asumiendo que la prueba de cELISA, que es referencia aceptada internacionalmente y que además está definida como confirmatoria definitiva por la legislación venezolana (Gaceta Oficial Resolución N° 127, 2003; OIE, 2000), es confiable al 100%, sólo en el 6,44% de los casos la prueba RBT coincidiría en predicciones positivas.

La ER de la prueba de RBT comparada con la cELISA derivada de los datos presentados en la tabla V, es del 99,96%. El muy alto porcentaje de ER observado en RBT se debe al elevado número de concordancia negativa (12.497 muestras) detectadas por ambas técnicas.

El uso de cELISA como prueba tamiz u operativa de despistaje está recomendado por autores y organismos de salud internacional (Gall *et al.*, 1998; OIE, 2000; Radostits *et al.*, 1999). En este sentido, Gall *et al.* (1998), en un ensayo realizado en cuatro países de América Latina, concluyeron que el uso

de esta prueba para el tamizaje constituiría una gran ventaja en los programas de control y erradicación de la enfermedad, debido a que al minimizar el número de ensayos implementados y el total de horas-hombre invertidas para los análisis, impacta positivamente en los costos de los programas de control y erradicación de la enfermedad, al mismo tiempo que permite el procesamiento de grandes cantidades de muestras en muy poco tiempo bajo condiciones altamente estandarizadas.

Como se acotó anteriormente, en Venezuela se han realizado una serie de trabajos donde la prueba de tamizado es la de RBT y con la sola excepción del ensayo reportado por D'Pool *et al.*, (2004), la prueba de cELISA no ha sido incluida en los estudios publicados hasta el momento; por lo tanto, es inestimable la cantidad de falsos negativos que no fueron sometidos a pruebas confirmatorias. Además, la mayoría de las muestras de animales reactivos fueron confirmadas con técnicas que según la OIE (2000) no son válidas para el comercio internacional e incluso para la

Prueba Lenta en Tubo (LT), Nielsen *et al.* (2002) llegó a recomendar su desuso definitivo debido a sus deficiencias en sensibilidad y especificidad. Por otro lado Radostits *et al.* (1999), señalan que la sensibilidad de la 2-M es de 59,9%, lo que puede indicar que un importante número de animales infectados no son eliminados del rebaño y pueden constituirse en fuente permanente de infección dentro del rebaño y para las personas.

Cabe resaltar, que en la resolución 127 del MAT de septiembre del 2003, se consideren iguales pruebas con comportamiento tan disímil como LT y cELISA, e incluso FC contra cELISA. Estas diferencias en comportamiento están ampliamente reportadas por McGiven *et al.* (2003), quienes indican que las pruebas de aglutinación pueden considerarse menos sensibles y específicas que FC, cELISA, ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada, al mismo tiempo que de estas últimas, FC es la que mostró el peor comportamiento diagnóstico. En este sentido, las técnicas de ELISA para el diagnóstico de Brucelosis pueden identificar títulos de anticuerpos significativamente más bajos de los que pueden detectar otras pruebas como RBT, LT o FC (D'Pool *et al.*, 2004; McGiven *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2002).

Los resultados encontrados en este estudio son muy similares a los reportados por D'Pool *et al.* (2004), donde la prevalencia oficial del municipio La Cañada de Urdaneta era de 0,20% mientras que con la prueba de cELISA se pudo estimar en 9,1%.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones encontradas en el área de estudio, en la mayoría de las UP que resultaron positivas a la prueba en leche para brucelosis PAL, la prueba oficial de campo RBT usada como tamiz, no pudo detectar animales reactores, razón por la cual no se remiten muestras a laboratorios de diagnóstico para realizar las pruebas confirmatorias y de esta manera se deja un importante número de animales afectados dentro de los rebaños. Esos animales sirven como fuente de infección tanto a animales como a seres humanos y afectan los niveles reproductivos y productivos de las UP.

El modelo matemático empleado siguiendo metodologías propuestas por la OIE (2006), permitió comprobar que el punto de corte de 30% de Inhibición del estuche comercial utilizado, era aplicable para esta

población de animales donde el verdadero estatus de la Brucelosis era desconocido.

La implementación de pruebas altamente sensibles, específicas, fáciles de realizar y estandarizadas como la cELISA detecta animales positivos de las UP que también tenían pruebas de leche PAL positivas. Una vez que estos animales son eliminados del rebaño, la prueba de vigilancia PAL se hizo negativa en las UP analizadas. Al eliminar estos animales positivos por cELISA de rebaños positivos a la PAL se contribuye a eliminar fuentes de infección dentro del rebaño y se impacta positivamente en la salud pública, reproducción y producción de las UP.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) por la colaboración, oportunas sugerencias y asesorías prestadas.

Al Convenio Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA) - Fundación de Capacitación e Innovación para el desarrollo rural (CIARA) - Gobernación del estado Lara.

A los productores adscritos al Programa Integral de Desarrollo Lechero (PIDEL) por el apoyo y la confianza recibida.

A la Fundación Nacional para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (NADBIO) y PIDEL por el financiamiento parcial de los ensayos.

LITERATURA CITADA

- Burkhard, M., J. Joorfar, C. Bunge and R. Helmuth. 2002. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR: towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 290-296.
- Contreras, J. A. 2009. Brucelosis en Enfermedades de los Bovinos, Diagnóstico, Tratamiento y Control. Tercera Edición. Barquisimeto, Venezuela. pp. 555-601.
- D' Pool, G., S. Rivera, T. Torres, M. Pérez, A. García, O. Castejón, N. Rojas. 2004. Prevalencia de Brucelosis Bovina mediante ELISA Competitivo en el municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 14: 168 – 176.

- Everitt, B. 1995. Commentary: Classification and cluster analysis. *BMJ*. 311: 535-586.
- Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela – Resolución N° 127. 2003. Normas para el Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis.
- Gall, D., A. Colling, O. Marino, E. Moreno, K. Nielsen, B. Pérez and L. Samartino. 1998. Enzyme Immunoassays for Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis: A Trial in Latin America. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5: 654 – 661.
- Greiner, M., C. Franke, D. Böhning and P. Schlattmann. 1994. Construction of and Intrinsic cut-off value for the sero-epidemiological study of *Trypanosoma evansi* infection in a canine population in Brazil: a New approach towards an unbiased estimation of prevalence. *Acta Tropical*. 56: 97 – 109.
- Malorny, B., J. Hoorfar, M. Hugas, A. Heuvelink, P. Fach, L. Ellerbroek, C. Bunge, C. Dorn, R. Helmuth. 2003. Interlaboratory diagnostic accuracy of *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*. 89: 241-249.
- McGiven, J., J. Tucker, J. Perrett, S. Stack, A. Brew M. 2003. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*. 278: 171 – 178.
- Nielsen, K. 2002. Diagnosis of Brucellosis by Serology. *Veterinary Microbiology*. 90: 447 – 459.
- OIE. 2000. Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines. *Office International Des Epizooties*. Paris., 4th edition.
- OIE. 2006. Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. *Office International Des Epizooties*. Paris. 2006.
- Olsen, S., M. Martuzzi and P. Elliott. 1996. Cluster analysis and disease mapping-why, when, and how? A step by step guide. *BMJ*. 313: 863 – 866.
- Olsen, S., M. Martuzzi and P. Elliott. 1996. Cluster analysis and disease mapping-why, when, and how? A step by step guide. *BMJ*. 313: 863 – 866.
- OPS. Organización Panamericana de la Salud. 2001. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. *Publicación Científica y Técnica N° 580*, Tercera Edición, Washington. Vol. 1, pp: 28 – 56.
- Radostits, O., C. Gay, D. Blood and K. Hincheliff. 1999. Medicina Veterinaria. *McGraw-Hill Interamericana*, Novena Edición, Madrid. Vol 1, pp: 1025 – 1042. 1999.
- Samartino, L. 2002. Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology*. 90: 71 – 80. 2002.
- Vargas, F. 2003. Situación Epidemiológica de la Brucelosis en Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias, DCV-UCLA*. 8: 69 – 79.