



Organización
Panamericana
de la Salud



Organización
Mundial de la Salud
OFICINA REGIONAL PARA LAS
Américas

PANAFTOSA

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Salud Pública Veterinaria

Ref: AFT-SPV/2018/001-ESP

INFORME SOBRE EL DESEMPEÑO DEL TEST ELISA-BKM16

5 de Febrero del 2018

Centro Pan-Americano de Fiebre Aftosa / Salud Publica Veterinaria de la Organización Pan-Americana de Salud/Organización Mundial de Salud (PANAFTOSA/SPV-OPS/OMS)

Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura y Abastecimiento (IB/SAA-SP) del Estado de São Paulo

Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA) de Brasil

National Centres for Animal Disease/Canadian Food Inspection Agency (NCAD/ CFIA) in Canadá.

MENCIONES

Este estudio se ha llevado a cabo con la colaboración entre PANAFTOSA/SPV-OPS/OMS, el Instituto Biológico de la Secretaria de Agricultura y Abastecimiento del Estado de Sao Paulo (IB/SAA-SP), el Departamento de Salud Animal (DSA) y la Estación Quarentenaria de Cananéia (EQC) del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA) de Brasil.

Este documento ha sido preparado por Anna Paula Alvim y Manuel J. Sanchez-Vazquez de PANAFTOSA/SPV-OPS/OMS en conjunto con con Edviges Maristela Pituco del IB/SAA-SP.

Otros autores que han participado en el estudio son Marina Silva Rosa y Julio Cesar Pompei de PANAFTOSA/SPV-OPS/OMS, Adriana Hellmeister de Campos Nogueira Romaldini, Alessandra F. de Castro Nassar y Daniela Pontes Chiebao del IB/SAA-SP; Alfonso Clavijo del (NCAD/CFIA) in Canadá; y Mateus Carvalho Silva Araujo, Hellen Martins da Quinta Simões del EQC/MAPA y Guilherme Henrique Figueiredo Marques del DSA/MAPA.

Contacto: sanchezm@paho.org

SUMARIO

El muermo es una enfermedad infecciosa de los solípedos y humanos causada por el bacilo Gram-negativo *Burkholderia mallei*. Esta es una enfermedad que requiere notificación inmediata de cualquier caso sospechoso en Brasil y los casos confirmados deben ser informados a la OIE.

Este trabajo provee información sobre el desempeño del ELISA, recientemente creado por PANAFTOSA-OPS/OMS usando una proteína recombinante (y denominado como ELISA-BKM16), en comparación con fijación de complemento y el Western Blot (también basado en la misma proteína recombinante), realizado en a través de tres estudios: con un panel conocido (56 sueros), a través de un seguimiento longitudinalmente en un ambiente controlado (en 21 caballos), y con muestras obtenidas de vigilancia (377 muestras).

En los resultados en las investigaciones con el panel conocido se llega a obtener una sensibilidad y una especificidad de 1. El estudio longitudinal en los animales aislados presenta (como esperado) una buena concordancia entre estas dos pruebas (ELISA-BKM16 y WB), mientras que FC presenta una variación longitudinal con alternancia entre positivo y negativo, y con la aparición de resultados anti-complementarios (AC). Incluso un animal eutanasiado, confirmado como positivo con PCR dio resultados positivos a ELISA y WB consintientes en los meses previos a la muerte, pero negativos a FC.

Igualmente, en las muestras del control de movimientos, el ELISA-BKM16 muestra muy buena concordancia comparado con el WB, pudiendo alcanzar una sensibilidad de 1 al mismo tiempo que mantiene una alta especificidad (de 0.99). Sin embargo, la sensibilidad del FC comparado con el WB fue de 0 con una especificidad fue de 0.99. Con los resultados de este estudio el ELISA BKM16 se presenta como una alternativa plausible a la FC para la vigilancia y control del muermo, ofreciendo buenas características operativas (sensibilidad y especificidad) además de ventajas costo-efectivas debido a su facilidad de ejecución en el laboratorio.

Palabras clave: *Muermo, ELISA, Fijación de complemento, Western Blot, Vigilancia*

1. INTRODUCCIÓN Y CONTEXTO

El muermo es una enfermedad infecciosa de los solípedos y humanos causada por el bacilo Gram-negativo *Burkholderia mallei* (Khan *et. al.*, 2013). El muermo es una de las enfermedades más antiguas conocidas de los caballos, y en el aspecto zoonótico es contagiosa y pudiendo llegar a ser fatal (Van Zandt *et. al.*, 2013).

De acuerdo con el Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales de la OIE, capítulo sobre muermo actualizado en 2015, la prueba de la fijación del complemento (FC) es un método serológico exacto y fiable para su uso en el diagnóstico de esta enfermedad, y es considerado de alta sensibilidad (OIE, 2017a). Sin embargo un estudio reciente demostró que su sensibilidad puede ser afectada por el protocolo usado con el riesgo de clasificar erróneamente con títulos bajos de FC (Laroucau *et. al.*, 2016), más probablemente se trata de animales crónicamente infectados. Este riesgo de falsos negativos, e incluso de falsos positivos, ha sido mencionado también por Malik (2016). El Western Blot (WB), por otro lado, se plantea como una alternativa en políticas de erradicación y en estudios de prevalencia (OIE, 2017a). Esta prueba se consideró de alta especificidad en un estudio en el que se usa una proteína bruta no recombinante (Elschner *et. al.*, 2011). Además el WB se ha planteado como una alternativa al FC para países endémicos (Elschner *et. al.*, 2011).

Los diferentes formatos de ELISA, entre ellos competitivo e indirecto, utilizando fracciones de *B. Mallei* bruta, purificada o recombinante, han sido desarrollados para auxiliar en el diagnóstico de muermo, siendo que el uso de diferentes antígenos afecta directamente a la especificidad del test. Las pruebas desarrolladas con la proteína TssB han presentado alta sensibilidad, alrededor del 99.7%, y especificidad del 100%, según Singha *et. al.* (2014). El uso de la proteína TssB recombinante tiene la ventaja de no presentar reactividad cruzada con *meliodosis*, siendo altamente específico para anticuerpos *B. mallei* (Malik, 2016; Singha *et. al.*, 2014); es decir, diferencia anticuerpos anti-*B. mallei* de anti-*B. pseudomallei*. Así, una prueba serológica específica capaz de detectar anticuerpos anti-*B. mallei* sin reactividad cruzada con otras bacterias del género *Burkholderia* es altamente deseable. Esta característica en el desarrollo del ELISA (y que también es aplicable al WB) ofrece ventajas en relación a la fijación de complemento, además de la facilidad y rapidez en su ejecución y una mejor relación costo-beneficio.

Aunque el muermo ha sido erradicado de varios países, ha recuperado el estatus de una enfermedad re-emergente debido a los numerosos brotes recientes (Khan *et. al.*, 2013). Concretamente en Sudamérica, la enfermedad ha recobrado recientemente un alto interés por parte de los servicios veterinarios, debido a una aparente reemergencia, particularmente en Brasil con varios brotes detectados en los últimos años. Por ese motivo está incluida en la lista de enfermedades de notificación obligatoria inmediata de cualquier caso sospechoso en Brasil para la aplicación de medidas de Defensa Sanitaria Animal, y los casos confirmados son informados a la OIE (Brasil, 2018, 2004a, OIE, 2017b, 2017c; Van Zandt *et. al.*, 2013).

Todo ello ha reabierto el debate sobre cuál es la mejor estrategia de vigilancia y sobre las herramientas diagnósticas usadas, particularmente en relación a la confirmación del diagnóstico del muermo. Actualmente, el método de FC recomendado en el Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales de la OIE para la confirmación de casos de la enfermedad, estudios

de prevalencia y programas de erradicación, presenta resultados inconsistentes. Se cree que esto puede ocurrir en vista de la situación epidemiológica brasileña, en que la enfermedad se presenta con baja ocurrencia, y en la mayoría de los casos los equinos son infectados crónicamente, por lo tanto con baja concentración de anticuerpos anti-*B. mallei* fijadores de complemento. Los estudios sobre la patogenia de la enfermedad en la especie equina son necesarios para aclarar esta hipótesis.

Buscando mejorar las características de desempeño del test, PANAFTOSA-OPS/OMS desarrolló el ELISA-BKM16, cuyo nombre viene de la primera y cuarta letra de “Burkholderia” junto con el número expresa el año en que fue desarrollada en 2016). Además, PANAFTOSA-OPS/OMS desarrolló también un WB utilizando ambos una proteína recombinante TssB de *B. mallei*.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es entender el desempeño del recientemente desarrollado ELISA- BKM16 comparando su rendimiento con otras pruebas existentes, como fijación de complemento (FC) que es actualmente usada en la vigilancia en Brasil, y con el Western Blot (WB) considerada como una alternativa de referencia a la FC. Este trabajo pretende ser una herramienta para entender las opciones actuales para el diagnóstico de muermo en la vigilancia y control rutinarios para Brasil y otros países de América del Sur.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. La estrategia

La estrategia de evaluación del rendimiento del test ELISA-BKM16 se realiza con tres componentes:

- Para el primer componente se hace una validación directa comparando los resultados del ELISA-BKM16 con un panel de referencia utilizado en los laboratorios oficiales de Brasil.
- Para el segundo componente se utilizaron muestras de caballos mantenidos en aislamiento en la Estación Cuarentenaria de Cananéia y monitoreados longitudinalmente con muestras de sangre tomadas cada 15 días. Estos animales fueron seleccionados a partir de los resultados positivos (o inconclusos) a FC en el control de tránsito y fueron cedidos para esta investigación.
- Para el tercer componente se compararon los resultados del ELISA-BKM16 y de FC con los del WB (tomando en este caso como prueba de referencia), utilizando muestras de control de tránsito de equinos. Se debe notar que las comparaciones entre el ELISA-BKM16 y el WB son esencialmente una comparación entre dos metodologías, asumiendo que el WB es una técnica que ofrece mejores características diagnósticas, pues estas dos pruebas están basadas en el mismo antígeno recombinante.

3.2. Metodología para la validación del ELISA-BKM16 con un panel conocido

3.2.1. Descripción de la prueba utilizada

El kit ELISA-BKM16 está diseñado para detectar anticuerpos contra *B. mallei* en los sueros de los equinos, determinando así la presencia de la infección por muermo. El kit permite realizar un ensayo

de ELISA indirecto en que un antígeno recombinante (de la proteína TssB) específico de la especie *B. mallei* es fijado en una microplaca de 96 cavidades. Cuando existe la presencia de un suero con anticuerpos específicos para la bacteria se forma un complejo antígeno-anticuerpo y los anticuerpos no específicos se eliminan de la placa después de la etapa de lavado. El complejo formado es reconocido por un segundo anticuerpo anti-IgG de caballo conjugado con la enzima peroxidasa. Una vez añadido al sustrato que contiene H₂O₂, esta enzima se liga al sustrato (cromógeno) y se desencadena la formación de complejos que presenta una coloración amarilla, indicando que se hizo el reconocimiento de anticuerpos contra *B. mallei*. Para normalizar los resultados se usó la siguiente fórmula: $(DO \text{ muestra} - \text{media DO CN}) / (\text{media DO CP} - \text{media DO CN}) * 100$. Donde DO es la densidad óptica obtenida en la prueba, CN el control negativo y CP el control positivo.

3.2.2. Descripción del panel y fuente de datos

En esta tarea se utilizó un panel cedido por el laboratorio nacional Agropecuario (LANAGRO) situado en Pernambuco. Este panel de 56 sueros (compuesto por sueros equinos, mulares y asnales) fue formado a partir de muestras con resultados positivos y negativos establecido de acuerdo a la normativa vigente de Brasil (Brasil, 2004a, 2004b).

3.2.3. Análisis estadísticos

Se calcularon la sensibilidad y la especificidad (Banoo *et. al.*, 2008) de la prueba de ELISA-BKM16 comparados con el panel de referencia de LANAGRO, junto con los intervalos de confianza del 95%, asumiendo que los datos se obtienen mediante muestreo binomial. Para el ELISA, se probaron diferentes puntos de corte de los resultados normalizados para identificar aquel que proporciona el mejor rendimiento.

3.3. Metodología para la comparación del desempeño de los test ELISA-BKM16, FC y WB en caballos investigados quincenalmente

3.3.1. Descripción de las pruebas utilizadas

La prueba de FC fue ejecutada de acuerdo con el protocolo establecido por el MAPA (BRASIL, 2018) en concordancia con la técnica descrita (OIE, 2017a), utilizando antígeno y sueros controles registrados en el MAPA o importados mediante autorización del MAPA, siguiendo la recomendación del fabricante para el periodo de incubación. En las pruebas se realizaron diluciones seriadas en la base 2, iniciando la dilución inicial del suero 1:5 hasta 1:320. Las interpretaciones consideradas fueron: NEGATIVA cuando presentaban el 100% de hemólisis en la dilución 1:5, INCONCLUSIVA (sospechoso), cuando quedaban entre el 25 y el 75% de hemólisis en la dilución 1: 5. POSITIVA, 100% sin hemólisis en la dilución 1:5 (Brasil, 2004b; OIE, 2017a).

En este caso el WB se trata de un ensayo inmuno-enzimático sensible consistente en un antígeno recombinante específico de la especie *B. mallei* fijado en tiras de nitrocelulosa; el mismo antígeno usado en el ELISA-BKM16. Cuando hay presencia de suero que contiene anticuerpos específicos para la enfermedad se forma un complejo antígeno-anticuerpos que es reconocido por un segundo anticuerpo dirigido contra inmunoglobulinas de la especie que está siendo investigada y a su vez marcado con una

enzima fosfatasa alcalina (anti-IgG de caballo conjugado con una enzima fosfatasa alcalina). Una vez añadido el sustrato adecuado para la enzima, se presenta como resultado la aparición de una banda de coloración violeta, indicando que se hizo el reconocimiento de anticuerpos contra *B. mallei*.

3.3.2. Descripción de fuente de las muestras

Utilizando los resultados de la prueba de FC en el control oficial de movimientos de animales, 21 equinos positivos e inconclusos de ambos sexos y diferentes razas y edades, fueron donados para la investigación, aportando una oportunidad para dar seguimiento longitudinal. Estos animales fueron mantenidos en aislamiento en la Estación Cuarentenaria del MAPA en Cananéia-SP en el período de julio de 2015 a agosto de 2017, siendo recolectadas quincenalmente muestras de sangre y de secreción nasal y ocular. Se destaca que la Estación Cuarentenaria del MAPA ofrece ambiente controlado, bioseguro, posee total aislamiento del área urbana y estructura apropiada para el mantenimiento de animales con enfermedades infecciosas. Hasta agosto de 2017 se obtuvieron 1400 muestras de suero de estos animales. Los sueros fueron analizados por FC, ELISA-BKM16 (aplicando un punto de corte de 20), WB para la detección de anticuerpos anti-*B. mallei* y PCR para detectar la presencia de *B. mallei* en las muestras de secreción nasal y ocular (OIE, 2017a).

Con una definición de foco como aquella unidad epidemiológica donde fue confirmado al menos un caso de muermo por el Servicio Veterinario Oficial. Todos los caballos que fueron llevados a Cananéia eran considerados de foco y estaban bajo investigación clínica y epidemiológica incluyendo los casos sospechosos y demás équidos del establecimiento. Hubo diferencias en los equinos investigados, de manera que en algunas situaciones la manifestación clínica en el origen era evidente y en otros casos no, pues en el momento del traslado los equinos ya estaban en la fase crónica de la enfermedad. De esta manera entraron en Cananéia animales con resultados “no negativos” en la FC ejecutados por el control oficial (es decir, positivos, inconclusos y otros que muestras actividad anticomplementaria). Hasta noviembre de 2016, en Cananéia había sólo equinos crónicamente infectados y negativos (confirmados por ELISA e WB). Ese noviembre entraron seis equinos provenientes de un foco en Capivari, monitoreados por el equipo de este estudio en los seis meses anteriores a ese ingreso y que en un primer estadio fueron considerados clínicos. Estos animales, además del test de FC oficial, fueron testados para FC, ELISA y WB por el equipo de estudio en el momento de la detección oficial; y fueron monitoreados seis meses antes del traslado a Cananea.

Este estudio fue aprobado por la comisión de ética sobre experimentación animal (CETEA-IB) en Julio del 2015. Así se certifica que el protocolo n° 142/15 que describe este estudio, está de acuerdo con los principios éticos de experimentación animal adoptados por la Sociedad Brasileña de Ciencia en Animales de Laboratorio (SBCAL/COBEA), por el Consejo Nacional de Control de Experimentación Animal (CONCEA) y la Directriz Brasileña para el Cuidado y Utilización de Animales para Fines Científicos y Didácticos (DBCA).

3.3.3. Análisis descriptivo

Los animales fueron evaluados de manera longitudinal utilizando los resultados de las muestras y manifestación clínica. Con la interpretación longitudinal de estos resultados, los animales fueron clasificados como: negativos) sin manifestación clínica aparente y sin reacción a ninguna de pruebas

de ELISA, WB y FC; positivos crónicos) sin manifestación clínica aparente, sin embargo reactivos a la mayoría de las pruebas de ELISA y WB y negativos a FC (con alguna excepción en este último debido a las fluctuaciones en los resultados de la prueba); y positivos agudos) con manifestación clínica característica de muermo y reactivos a las 3 pruebas (con alguna excepción en la FC debido a las fluctuaciones en los resultados de la prueba).

3.4. Metodología para la comparación del desempeño de los test ELISA-BKM16 y FC en la vigilancia en el control de movimientos comparado con el WB

3.4.1. Descripción de la prueba estándar de referencia utilizada

Para esta comparación se usó como referencia la prueba del WB. El desarrollo de la prueba WB utilizada ya ha sido descrito anteriormente en este documento.

3.4.2. Descripción de las prueba a comparar

El desarrollo de las prueba de FC y ELISA-BKM16 ya ha sido descrita anteriormente en este texto documento.

3.4.3. Descripción del panel y fuente de datos

En esta tarea se utiliza un panel compuesto por 377 muestras de suero analizadas por FC para muermo, obtenidos de los laboratorios Paddock de São Paulo-Brasil (282 muestras), e Instituto Biológico (95 muestras), ambos acreditados por la Coordinación General de Acreditación - (Cgcre) – Inmetro; y acreditados y homologados por el Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA) para realizar ensayos y emitir resultados en Atención a los programas y controles oficiales. La recolección de sangre ocurrió entre los días 10 de abril de 20117 y el 22 de mayo de 2017, de equinos originarios de los Estados de RJ (2) MG (17), MS (4), SC (53), GO (6), RS (67), PR (28), SP (200) con el propósito de movimiento. Las muestras se analizaron mediante fijación de complemento dentro de las 24 horas después de la llegada a los laboratorios.

3.4.4. Análisis estadísticos

Se calcularon la sensibilidad y la especificidad de la prueba de FC y ELISA-BKM16 comparados con el WB utilizado (Banoo *et. al.*, 2008), junto con los intervalos de confianza del 95%, asumiendo que los datos se obtienen mediante muestreo binomial. Para el ELISA, se probaron diferentes puntos de corte para identificar aquel que proporciona el mejor rendimiento. Además, se calculó la curva característica de funcionamiento del receptor (ROC, por su denominación en inglés “receiver operating characteristic”) para evaluar gráficamente el rendimiento del ELISA para los diferentes valores de corte (Sing *et. al.*, 2005). Aunque este ejercicio no pretende ser una validación en sí misma, sino que más una comparación en relación al desempeño del WB, se decidió utilizar las medidas de sensibilidad y especificidad en lugar de otras medidas de concordancia (como puede ser el Kappa). Aquellas (sensibilidad y especificidad) resultan más informativas para la interpretación del

desempeño en relación al objetivo del estudio; por ejemplo para entender la presencia de posibles falsos negativos y falsos positivos.

Todos los análisis mencionados anteriormente se realizaron con la versión R 2.5.1 de R (R Core Team, 2016), paquetes “bdpv” y “ROCR”.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados para la validación del ELISA-BKM16 con un panel conocido

4.1.1. Descripción de los resultados del panel conocido

Este panel está compuesto por 22 muestras negativas y 34 positivos de acuerdo a la normativa vigente de Brasil (Brasil, 2004a, 2004b). La distribución de los valores normalizados del ELISA-BKM16 se encuentra entre -39.6 y 472.1, con una mediana de 160.6 (ver Figura 1).

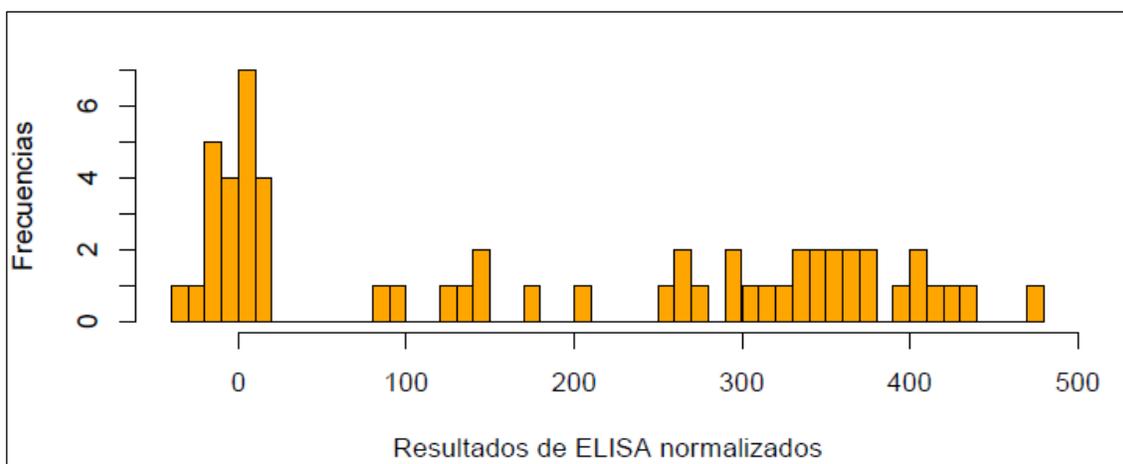


FIGURA 1. Representación del histograma con la distribución de las frecuencias de los diferentes resultados ELISA-BKM16 con un panel conocido de 56 muestras.

4.1.2. Resultados del desempeño del ELISA-BKM16 comparado con el panel

Para los diferentes puntos de cortes del ELISA intentados (entre 0 y 45), mostrados en la Tabla 1, la sensibilidad no varía, es de 1. Sin embargo la especificidad va en aumento hasta que llegamos al punto de corte de 20, a partir del cual la especificidad lograda es de 1.

TABLA 1. Resultados de los cálculos para sensibilidad (Se) y especificidad (Sp), comparando el ELISA (10 diferentes puntos de corte) con un panel de referencia de LANAGRO como referencia. N = 56.

Cut-off	Se	95% CI	Sp	95% CI
0	1	0.9-1	0.5	0.28-0.72
5	1	0.9-1	0.68	0.45-0.86
10	1	0.9-1	0.73	0.5-0.89
15	1	0.9-1	0.86	0.65-0.97
20	1	0.9-1	1	0.85-1
25	1	0.9-1	1	0.85-1
30	1	0.9-1	1	0.85-1
35	1	0.9-1	1	0.85-1
40	1	0.9-1	1	0.85-1
45	1	0.9-1	1	0.85-1

Como observamos en el gráfico representado la función de densidad (estimado de la densidad de kernel) de los resultados de ELISA para las muestras negativas y positivas (Figura 2), estas subpoblaciones están muy bien diferenciadas con los resultados de muestras negativas con valores muy bajos en el ELISA, y los resultados positivos con valores más altos.

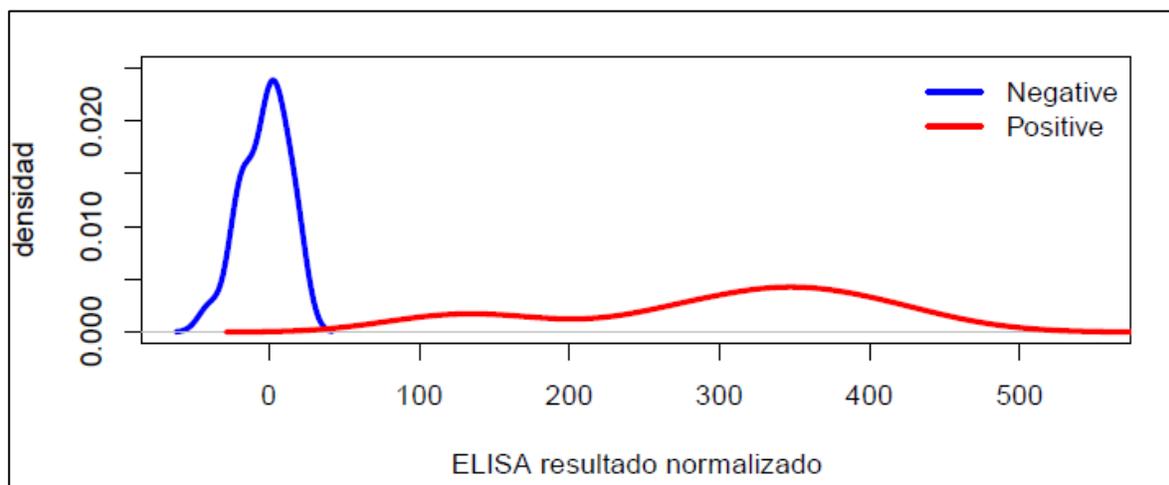


FIGURA 2. Función de densidad de kernel de los resultados de ELISA-BKM16 para las muestras negativas y positivas con un panel conocido de 56 muestras.

4.2. Resultados para la comparación del desempeño de los test ELISA-BKM16, FC y WB en caballos investigados quincenalmente

De acuerdo a los resultados longitudinales presentados en la Tabla 2 y Figura 3, los animales a, c, d, e, g, o, q, r, t, u, fueron considerados como verdaderos negativos, los animales b, f, h, p, s como positivos crónicos y los animales i, j, k, l, m, n como positivos clínicos. Estos últimos fueron los animales del foco de Capivari, y que fueron monitoreados por el equipo de este estudio durante los seis meses anteriores al traslado a Cananea. En la fase aguda de la enfermedad, estos animales presentaron manifestación clínica típica de la enfermedad y dieron positivo a las tres pruebas (FC, ELISA y WB). Los seis animales que sobrevivieron del foco se volvieron crónicamente infectados, negativos en la FC y manteniendo la positividad en el ELISA y WB, perfil que se mantuvo todo el período monitoreado (antes y después del traslado a Cananea).

Los resultados de PCR de swabs nasales realizados periódicamente a todos los animales obtuvieron resultados negativos (como esperado en animales crónicos o negativos presentes en la estación de Cananea) (OIE, 2017a). Se observa una clara consistencia longitudinal y concordancia entre los resultados de WB y ELISA como observamos tanto en los caballos negativos como en aquellos positivos, a excepción del caballo “s” (un macho entero), para el que el resultado del ELISA oscila en el tiempo. Mientras que los resultados de FC presenta una variación longitudinal con alternancia entre positivo y negativo, y con la aparición de resultados anti-complementarios (AC) donde no se permite obtener un resultado para esta prueba.

El animal “h” se detecta como positivo al ELISA y WB a partir del día 240, mientras aun aparece como negativo a FC en ese momento. Se considera que este animal tuvo una seroconversión después de una larga incubación (de al menos 8 meses) o que tuvo una reactivación. Se encuentra poco probable que la infección aconteciera en la estación de cuarentena, pues no se detectó la bacteria en las secreciones nasales en ningún caso.

El animal “n” es el único de los investigados del que se hizo el examen post mortem tras ser eutanasiado. Se le realizó la necropsia y los hallazgos anatomopatológicos eran compatibles con muermo: Neumonía purulenta con múltiples abscesos y granulomas, habiendo asociado células gigantes de Langhans. Hepatitis purulenta. Glomerulonefritis membranoproliferativa moderada, no purulenta. Hemosiderosis esplénica (como reflejo de una posible anemia). Las lesiones histopatológicas observadas por la técnica de coloración hematoxilina- eosina fueron compatibles con muermo y se obtuvo un resultado positivo a PCR en el exudado purulento hallado en la tráquea. Este animal como se observa en la Figura 3 tuvo resultados positivos a WB y ELISA durante el periodo de monitoreo en Cananea, más los seis meses adicionales anteriores al traslado a la estación; mientras que en el periodo de Cananea los resultados de FC fueron negativos.

TABLA 2. Resumen de la información de los caballos y los resultados de categorización en función de los resultados longitudinales.

ID del animal	Sexo	Fecha de inicio del seguimiento en la estación de Cananea	Clasificación de acuerdo a la investigación longitudinal
a	Hembra	jun/15	Verdadero negativo
b	Hembra	jun/15	Positivo crónico
c	Hembra	jun/15	Verdadero negativo
d	Hembra	jun/15	Verdadero negativo
e	Macho castrado	jun/15	Verdadero negativo
f	Macho castrado	jun/15	Positivo crónico
g	Macho castrado	jun/15	Verdadero negativo
h	Macho castrado	jul/15	Positivo crónico
i [¥]	Hembra	nov/16	Positivo clínico
j [¥]	Hembra	nov/16	Positivo clínico
k [¥]	Macho Joven	nov/16	Positivo clínico
l [¥]	Hembra joven	nov/16	Positivo clínico
m [¥]	Joven	nov/16	Positivo clínico
n ^{¥€}	Hembra	nov/16	Positivo clínico
o	Macho castrado	jun/15	Verdadero negativo
p	Hembra	jun/15	Positivo crónico
q ^Ω	Macho castrado	jul/15	Verdadero negativo
r	Hembra	jul/15	Verdadero negativo
s	Macho entero	jul/15	Positivo crónico
t	Hembra	jun/15	Verdadero negativo
u	Macho Castrado	jun/15	Verdadero negativo

[¥] Animales procedes del brote de Capivari monitoreados desde los 6 meses anteriores al ingreso en la estación de Cananea

El animal n[€] fue eutanasiado y se le realizó la necropsia donde se confirmó la enfermedad por PCR e histopatología.

El animal q^Ω era un animal maleinizado

TABLA 3 presentando los resultados del estudio longitudinal quincenal desde el ingreso de los animales en Cananea para las pruebas de ELISA, WB y FC para detección de anticuerpos anti-*B. mallei*. Para los animales procedentes del brote de Capivari se incluyen también los resultados del seguimiento longitudinal mensual anterior al traslado a Cananea.

4.3. Resultados para la comparación del desempeño de los test ELISA-BKM16 y FC en la vigilancia en el control de movimientos

4.3.1. Descripción de los resultados del panel

Los resultados del WB revelaron 365 muestras negativas y 12 positivas. Para el FC hubo 374 negativas y 3 positivas. Los resultados normalizados del ELISA oscilaron desde -19,46 a 165,1, con una mediana de -2.23. El histograma se presenta en la Figura 3.

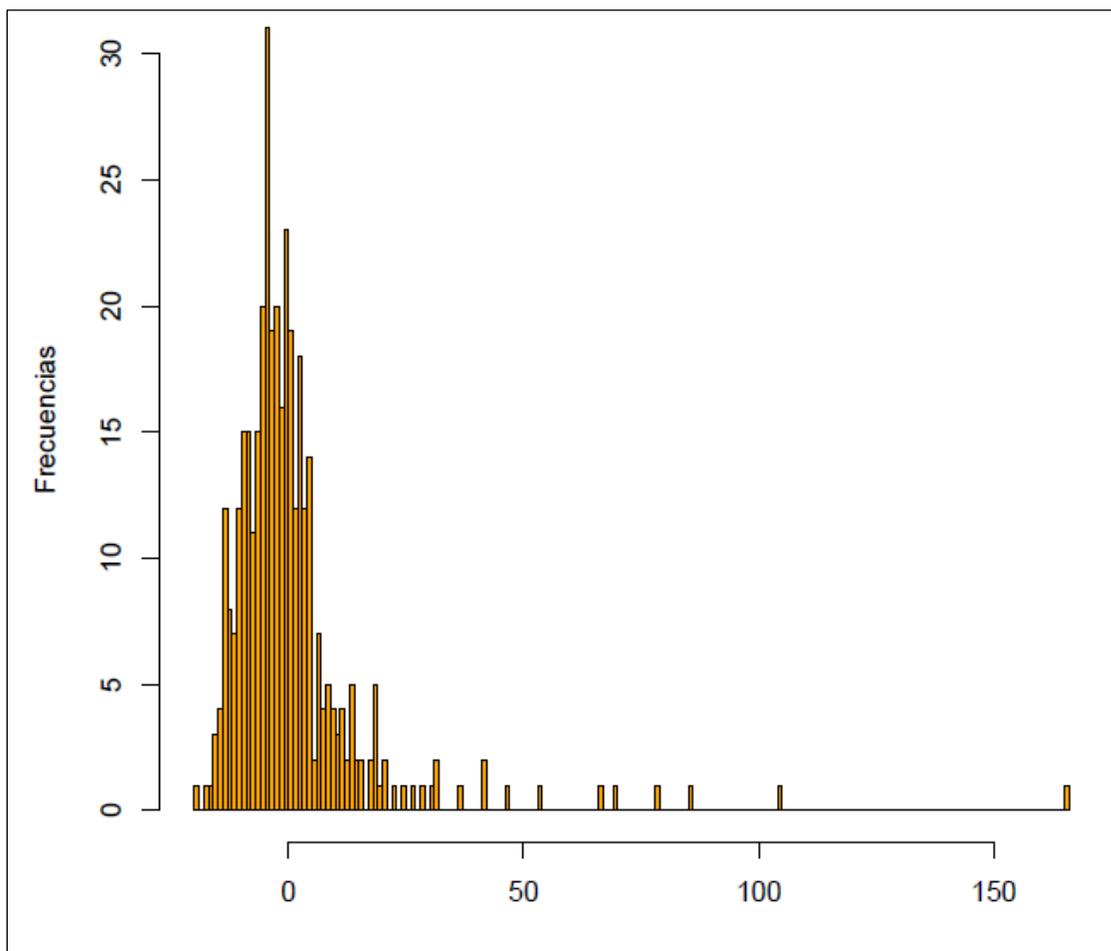


FIGURA 3. Representación del histograma con la distribución de las frecuencias de los diferentes resultados del ELISA-BKM16 con un panel de 372 muestras.

4.3.2. Resultados del desempeño de la FC en comparación con WB en la vigilancia en el control de movimientos

Los resultados para la sensibilidad y especificidad de la comparación de FC con la prueba de referencia utilizada, el WB, para los diferentes niveles de prevalencia se presentan en la Tabla 4. La sensibilidad del FC comparado con el WB fue de 0 (IC del 95%: 0-0.26), pues ninguno de los 12

resultados positivos identificados por el WB fueron identificados como positivos por la FC. Mientras que de los 365 sueros identificados como negativos por WB, 362 fueron identificados como tal por FC, especificidad de 0.99 (IC del 95%: 0.99-1). Ninguno de los 3 positivos detectados por FC fueron confirmados en el WB.

TABLA 4. Resultados de los cálculos para sensibilidad (Se) y especificidad (Sp), comparación de FC con el WB como referencia. N= 377.

Variables	Estimado	95% CI
Se	0	0-0.26
Sp	0.99	0.98-1

4.3.3. Resultados del desempeño del ELISA-BKM16 en la vigilancia en el control de movimientos

Como observamos en la Tabla 5, en los diferentes puntos de corte del ELISA intentados (entre 0 y 45) la sensibilidad se mantiene de 1 hasta el punto de corte 20. Del punto de corte del 0 al 25 la especificidad va incrementado y a partir de ahí permanece inalterada en estas investigaciones. Así en el punto de corte 20, se mantiene una sensibilidad de 1, con una especificidad alta, del 0.98.

TABLA 5. Resultados de los cálculos para sensibilidad (Se) y especificidad (Sp), comparando el ELISA (10 diferentes puntos de corte) con el WB como referencia. N = 377.

Cut-off	Se	95% CI	Sp	95% CI
0	1	0.74-1	0.64	0.59-0.69
5	1	0.74-1	0.85	0.81-0.88
10	1	0.74-1	0.91	0.87-0.93
15	1	0.74-1	0.95	0.92-0.97
20	1	0.74-1	0.98	0.96-0.99
25	0.92	0.62-1	0.99	0.97-1
30	0.92	0.62-1	0.99	0.98-1
35	0.75	0.43-0.95	0.99	0.98-1
40	0.67	0.35-0.9	0.99	0.98-1
45	0.5	0.21-0.79	0.99	0.98-1

4.3.3.1. Curva característica de funcionamiento del receptor (ROC)

Los resultados de la sección anterior en la que sensibilidad planteaba usar como recomendación el punto de corte 20 en esta prueba, son también ratificados en la ROC curve presentada en la Figura 4. En esta curva se observa que en el punto de corte 20 se obtendría el mejor balance entre la máxima sensibilidad y una óptima especificidad, y por tanto es donde se obtiene el mayor área debajo de la curva.

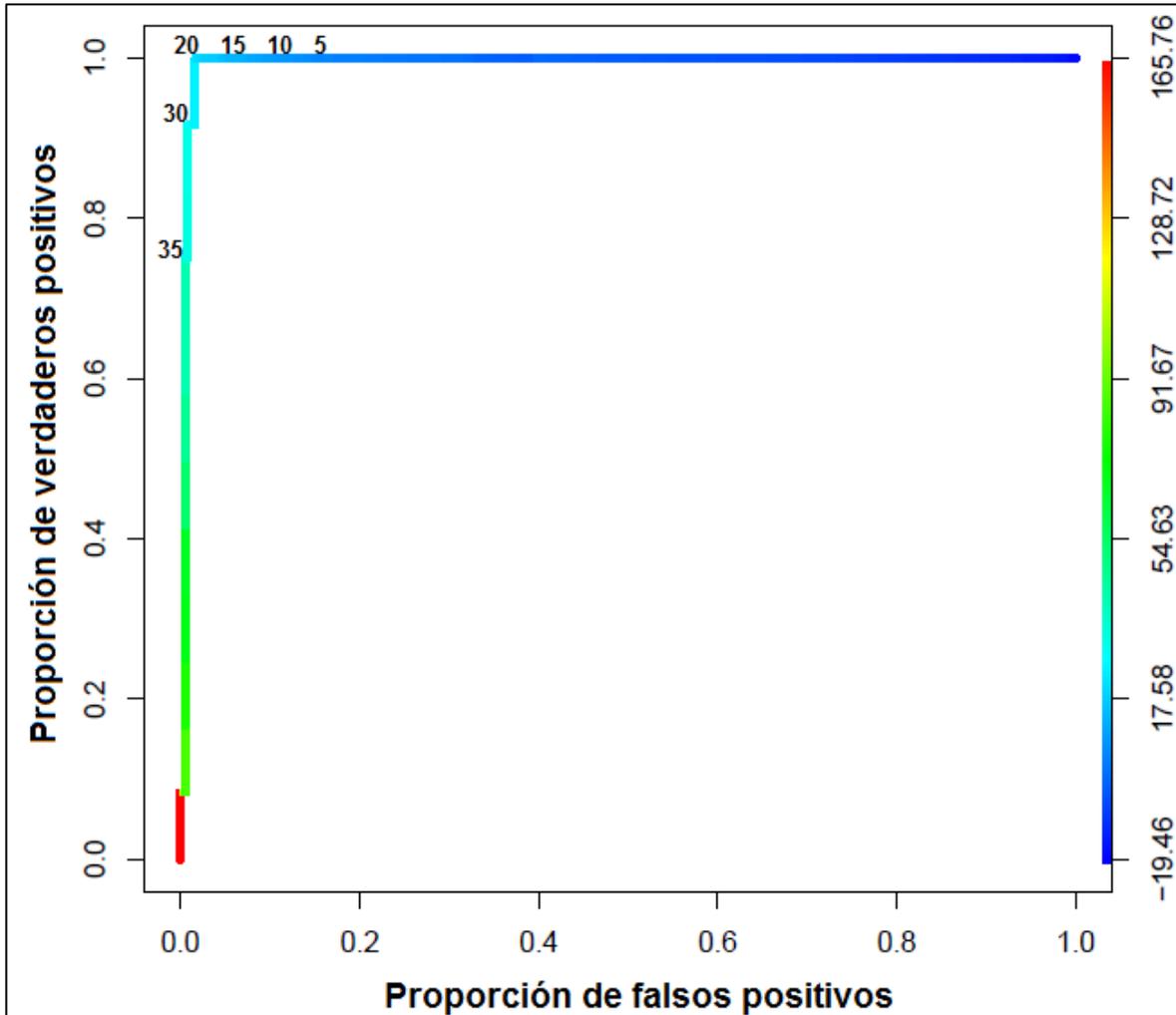


FIGURA 4. Curva característica de funcionamiento del receptor (ROC) para ELISA-BKM16 con un panel de 372 muestras evaluada con 10 diferentes puntos de corte de 0 a 45.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo provee importante información sobre el desempeño del recientemente creado ELISA-BKM16 en comparación con FC y el WB, en tres estudios diferentes: con un panel conocido, con muestras obtenidas de vigilancia en una situación de seguimiento y longitudinalmente en un ambiente controlado.

El ELISA-BKM16 desarrollado, como está presentado en este trabajo, ofrece unas buenas características de desempeño. Este ELISA puede utilizarse para la detección de anticuerpos anti-*B. mallei* en sueros de equinos y ha presentado repetibilidad y reproducibilidad adecuada en los ensayos de desarrollo (datos no mostrados en este estudio), hecho constatado por los resultados de los análisis quincenales de los equinos positivos y negativos aislados en estudio longitudinal de Cananea descrito. Además permite ajustar el punto de corte para optimizar la sensibilidad o la especificidad en función de la estrategia deseada.

En los trabajos aquí presentados, en las investigaciones con el panel conocido se llega a obtener una sensibilidad y una especificidad del 100%. Igualmente, el estudio longitudinal en los animales aislados en Cananea presenta una buena concordancia entre estas dos pruebas (ELISA-BKM16 y WB). Igualmente, en las muestras del control de movimientos, el ELISA-BKM16 muestra muy buena concordancia comparado con el WB, pudiendo alcanzar una sensibilidad del 100% al mismo tiempo que mantiene una alta especificidad (del 98%), tal y como fue mencionado en previos estudios por el uso de la proteína TssB (Malik, 2016; Singha *et. al.*, 2014). Esta buena concordancia de hecho está dentro de lo esperado, pues ambas pruebas se desarrollaron con el mismo antígeno recombinante. El valor añadido de esta comparación viene de que el desempeño del ELISA-BKM16 está al nivel del WB, que es una prueba considerada más robusta.

Por el contrario, los resultados de las comparaciones de FC con WB en las en las muestras del control de movimientos arrojan una pobre concordancia, con una baja sensibilidad de FC. Esto es también observado en el estudio longitudinal en los animales aislados en Cananea; incluso en un animal que murió eutanasiado y en el que el muermo se confirmó en la necropsia y con PCR, los resultados de FC en los meses previos a la muerte fueron negativos. Este hecho indica que esa yegua fue positiva en la FC sólo en la fase aguda de la enfermedad, en la primera colecta de la serie, realizada por el laboratorio oficial. Se pueden producir resultados falsos negativos en FC en equinos crónicamente infectados por la presencia de bajos títulos de anticuerpos (por debajo del umbral de detección de la prueba), o a problemas relacionados con los insumos de la prueba de fijación de complemento (antígeno, complemento, hematíes de oveja, hemolisina, etc.). De igual manera se pueden observar baja especificidad (con falsos positivos) debido a reactividad cruzada con otras bacterias Burkholderia, o relacionado con hematíes fragilizados (viejos) o suero no inactivado y de baja especificidad (dependiendo del antígeno adsorbido en el hemato). Souza (2012) también encontró estas inconsistencias con FC.

Con respecto al uso en la vigilancia y control del muermo control, los resultados de este trabajo sugieren que el ELISA BKM16 está indicado para la confirmación de casos de muermo tanto en la fase aguda y crónica de la enfermedad. La única inconsistencia que presentó el ELISA BKM16 con respecto al WB en el seguimiento longitudinal de Cananea fue en un caballo entero en que los resultados de

WB eran consistentemente positivos, mientras que el ELISA presentó fluctuaciones en los resultados. Se piensa que tal vez algún nivel hormonal pueda interferir en la prueba de ELISA.

Con los resultados de este estudio el ELISA BKM16 se presenta como una alternativa plausible para la vigilancia y control del muermo, ofreciendo buenas características operativas (sensibilidad y especificidad) además de ventajas costo-efectivas debido a su facilidad de ejecución en el laboratorio.

6. OTRAS MENCIONES Y AGRADECIMIENTOS

Se agradece por las donaciones de equinos y el apoyo en la logística de transporte a: Coordenadoria de Defesa Agropecuária/ Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a la Polícia Militar do Espírito Santo y la Polícia Militar do Estado de São Paulo. Adicionalmente se agradece la colaboración del laboratorio Paddock. A Paolo Duarte de PANAFTOSA/SPV-OPS/OMS por su revisión.

7. REFERENCIAS

- Banoo, S., Bell, D., Bossuyt, P., Herring, A., Mabey, D., Poole, F., Smith, P.G., Sriram, N., Wongsrichanalai, C., Linke, R., O'Brien, R., Perkins, M., Cunningham, J., Matsoso, P., Nathanson, C.M., Olliaro, P., Peeling, R.W., Ramsay, A., 2008. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:Doi 10.1038/Nrmicro1523
- Brasil, 2018. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 6, DE 16 DE JANEIRO DE 2018 - Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), publicada no DOU em 17 de janeiro de 2018, Seção.
- Brasil, 2013. IN 50, 24 DE SETEMBRO DE 2013 - Lista de doenças animais, de notificação obrigatória em território brasileiro, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, Brasil.
- Brasil, 2004a. Instrução normativa n° 24 de 05 de abril de 2004 - Controle e erradicação de mormo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- Brasil, 2004b. Instrução Normativa n° 12 de 29 de janeiro de 2004, Requisitos de Qualidade para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios para Diagnóstico Sorológico do Mormo por meio da Técnica de Fixação do Complemento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Aba.
- Elschner, M.C., Scholz, H.C., Melzer, F., Saqib, M., Marten, P., Rassbach, A., Dietzsch, M., Schmoock, G., de Assis Santana, V.L., de Souza, M.M., Wernery, R., Wernery, U., Neubauer, H., 2011. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet. Res.* 7, 4. doi:10.1186/1746-6148-7-4
- Khan, I., Wieler, L.H., Melzer, F., Elschner, M.C., Muhammad, G., Ali, S., Sprague, L.D., Neubauer, H., Saqib, M., 2013. Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 204–221. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x
- Laroucau, K., Colaneri, C., Jaÿ, M., Corde, Y., Drapeau, A., Durand, B., Zientara, S., Beck, C., 2016. Interlaboratory ring trial to evaluate CFT proficiency of European laboratories for diagnosis of

- glanders in equines. *Vet. Rec.* 2008, vetrec-2015-103617. doi:10.1136/vr.103617
- Malik, P., 2016. Harmonising diagnostic testing for glanders in equids. *Vet. Rec.* 178, 630–631. doi:10.1136/vr.i3093
- OIE, 2017a. Capítulo 2.5.11. Muermo, version actualizada en 2015. Manual Terrestre de la OIE.
- OIE, 2017b. World Animal Health Information Database (WAHIS interface). Exceptional epidemiological events.
- OIE, 2017c. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force.
- R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing.
- Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N., Lengauer, T., 2005. ROCr: Visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics* 21, 3940–3941. doi:10.1093/bioinformatics/bti623
- Singha, H., Malik, P., Goyal, S.K., Khurana, S.K., Mukhopadhyay, C., Eshwara, V.K., Singh, R.K., 2014. Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines. *Sci. World J.* 2014. doi:10.1155/2014/469407
- Souza, M.M.A., 2012. Diagnóstico do mormo através da técnica de fixação do complemento utilizando-se diferentes antígenos e métodos de incubação. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária – Área de Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Van Zandt, K.E., Greer, M.T., Gelhaus, H., 2013. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 131. doi:10.1186/1750-1172-8-131

Editado en febrero del 2018



PANAFTOSA
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Salud Pública Veterinaria