

EVALUACIÓN DE DOS ELISAS COMERCIALES PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS FRENTE A *SALMONELLA* SPP EN CERDOS DE MATADERO

Mainar Jaime, R.C.¹, Atashparvar, N². Chirino-Trejo, M³

1. Unidad Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria –CITA–, Gobierno de Aragón. Apdo. Correos 727. 50080 Zaragoza, España. 2. Dept. of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Lorestan University Khorram-Abad, Iran P.O. BOX:465. 3. Dept. of Veterinary Microbiology, WCVU, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, S7N 5B4 Saskatchewan, Canada. E-mail: rcmainar@aragon.es

INTRODUCCIÓN

En los países industrializados la salmonelosis es una de las infecciones con mayor prevalencia de entre las transmitidas al hombre por alimentos contaminados y una de las principales causas de mortalidad (Mead *et al.*, 1999). La carne de cerdo se considera la segunda fuente de salmonelosis humana (Steinbach y Hartung, 1999) y supone del 10% al 23% de la incidencia total (Hald and Wegener, 1999). Los programas de control de salmonelosis porcina se basan en la monitorización del status de infección de los rebaños mediante el uso de pruebas serológicas (ELISAs) que sólo han sido validadas con respecto al cultivo bacteriológico de heces o ganglios mesentéricos, una técnica muy poco sensible que no se relaciona necesariamente con la presencia de anticuerpos (Ac) específicos de *Salmonella* a nivel individual (Casey *et al.*, 2004; Funk *et al.*, 2005; Nollet *et al.*, 2005). La evaluación del rendimiento diagnóstico de la serología para salmonelosis porcina es complicada por la ausencia de adecuadas pruebas de referencia.

Recientemente se han desarrollado diferentes aproximaciones estadísticas, entre las que cabe destacar las basadas en la teoría bayesiana, que permiten evaluar la precisión de las pruebas de diagnóstico en ausencia de pruebas de referencia (Enoe *et al.*, 2000). Estos métodos se basan en la utilización de 2 o más pruebas diagnósticas que se aplican sobre individuos de 2 o más poblaciones y requieren que, para enfermedades infecciosas agudas como salmonelosis, las pruebas midan la misma condición (p. ej. anticuerpos). Otro requisito es que la precisión diagnóstica de las pruebas que se utilizan también debe ser constante en las poblaciones estudiadas. Los resultados se obtienen a partir de la combinación de información previa disponible sobre la precisión de las pruebas y de la prevalencia esperada en las poblaciones analizadas y los propios resultados obtenidos a partir de las pruebas. En este estudio utilizamos la estadística bayesiana para estudiar la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de 2 ELISAs para la detección de Ac específicos frente a *Salmonella* spp en cerdos sacrificados en matadero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras de jugo muscular (JM) y ganglios ileocecales (GI) de 232 cerdos sacrificados en 3 mataderos de Saskatchewan (Canadá). Mediante bacteriología convencional de GI se identificaron los cerdos infectados por *Salmonella* spp (Mainar-Jaime *et al.*, 2007). Los animales fueron entonces divididos en 2 poblaciones de 116 animales de forma que el número de cerdos infectados y la distribución de serotipos/serogrupos fuera similar en cada población.

Los ELISAs utilizados fueron SvanovirTM (Svanova Biotech AB, Suecia -ELISA A-) y HerdCheckTM (Idexx, EE.UU -ELISA B-). Ambos se desarrollaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Para el ELISA A se utilizó como umbral de positividad un porcentaje de densidad óptica (DO%) $\geq 20\%$ y para el ELISA B $\geq 10\%$.

El análisis bayesiano para la determinación de la Se y Es de los dos ELISAs se realizó con el software Winbugs (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/>) y utilizando el modelo "2 poblaciones, 2 pruebas condicionalmente relacionadas" desarrollado por Branscum *et al.*, 2005. La información previa disponible sobre la Se y Es de los ELISAs se obtuvo a partir de estudios experimentales (van der Heijden, 2001). La prevalencia de Ac esperada en las 2 poblaciones se estimó a partir de los resultados bacteriológicos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 232 JM, 14.6% (95%CI=10, 19) fueron positivos con el ELISA A y 8.6% (5, 12) con el B (Tabla 1). Los resultados de Se y Es para ambas pruebas se presentan en la Tabla 2. Cuando se utilizó la información previamente publicada sobre estas 2 pruebas serológicas y sobre la posible prevalencia de anticuerpos en las dos poblaciones (modelo 1, Tabla 2) los resultados de Se y Es para el ELISA A y B fueron, respectivamente, 62% (95% intervalo de probabilidad (IP)=41, 80), 89% (84, 94), 72% (60, 83), 96% (91, 98). Las prevalencias estimadas fueron 6% (1, 14) y 11% (4, 21). Cuando no se utilizó información previa sobre la prevalencia de las poblaciones (modelo 2, Tabla 2) o sobre el ELISA A (modelo 3, Tabla 2) se obtuvieron unos resultados similares, aunque en este último caso la Se del ELISA A subió al 71%. El modelo que no utilizaba información para el ELISA B (modelo 4) se descartó al no alcanzar adecuada convergencia estadística (diferentes resultados eran posibles). En general, la Se y la Es del ELISA A se mantuvo por debajo de la del ELISA B en los tres modelos válidos. La mayor Se del ELISA B podría deberse al uso de un antígeno de mayor espectro (frente a serogrupos B, C₁ and D de *Salmonella*) comparado con el del ELISA A (únicamente frente a B and C₁). Así el ELISA B podría haber detectado animales con anticuerpos circulantes que no eran reconocidos por el A, tales como el serotipo Give (Tabla 3). La falta de Es mostrada por ambas pruebas podría explicarse por reacciones cruzadas con otras bacterias que presentan determinantes antigénicos comunes a nivel del lipopolisacárido. La mayor seroprevalencia observada con el ELISA A (Tabla 1) podría así explicarse por su menor Sp (89%) cuando se compara con el B (96%). La detección de anticuerpos no se asoció con la presencia de bacterias en GI.

A pesar de que ambos ELISAs estaban diseñados para detectar anticuerpos específicos frente a *S. Typhimurium*, éstos sólo identificaron el 20% de los cerdos infectados con este serotipo (Tabla 3). Estos animales pertenecían a lotes que pasaron más de 12 horas en los corrales de espera del matadero. Este tiempo podría haber sido suficiente para infectar a los animales sin que éstos llegaran a desarrollar una respuesta inmune (Gray et al, 1996; Hurd et al 2001).

Los resultados también sugieren que la Se de las pruebas varía de forma importante en función de los serotipos involucrados (Tabla 3). Por ello, el conocimiento de los serotipos de *Salmonella* presentes en una región es necesario para determinar la precisión de las pruebas serológicas.

Tabla 1. Resultados de los dos ELISAs (A y B) en las dos poblaciones creadas.

		Población 1 ELISA B		Población 2 ELISA B		TOTAL
		+	-	+	-	
ELISA A	+	6	10	7	11	34
	-	1	99	6	92	198
TOTAL		7	109	13	103	232

Tabla 2. Resultados de sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de los dos ELISAs y de la prevalencia de anticuerpos en las dos poblaciones (P₁ y P₂) según los diferentes modelos bayesianos utilizados.

	Mediana (%) (Intervalo de credibilidad 95%)					
	Se _A	Es _A	Se _B	Esp _B	P ₁	P ₂
Modelo 1 ^a	62 (41,80)	89 (84, 94)	72 (60, 83)	96 (91, 98)	6 (1, 14)	11 (4, 21)
Modelo 2 ^b	61 (39, 80)	88 (83, 94)	73 (61, 83)	95 (90, 98)	4 (0, 12)	10 (1, 20)
Modelo 3 ^c	71 (22, 98)	90 (83, 96)	72 (58, 83)	95 (91, 98)	6 (1, 14)	11 (4, 20)
Modelo 4 ^d	57 (34, 77)	91 (84, 97)	38 (10, 78)	95 (89, 99)	10 (2, 24)	16 (5, 32)

^aUtilizó información previa para todos los parámetros; ^bNo utilizó información previa para P₁ y P₂; ^cNo utilizó información previa sobre el ELISA A; ^dEste modelo no utilizó información previa sobre el ELISA B pero fue desechado por no alcanzar convergencia.

Tabla 3. Cerdos infectados con *Salmonella* spp en ganglios ileocecales y sensibilidad relativa (Se%) de los ELISAs estudiados.

Serotipos	Nº. de cerdos	ELISA A (Se%)	ELISA B (Se%)
Typhimurium	5	1 (20)	1 (20)
Mbandaka	1	1 (100)	0
Litchfield	1	0	0
Give	1	0	1 (100)
Enteritidis	2	2 (100)	2 (100)
Derby	2	1 (50)	0
TOTAL	12	5 (41.6)	4 (33.3)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Branscum AJ, Gardner IA, Johnson WO. 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, 68:145-163.
- Casey PG, Butler D, Gardiner GE, Tangney M, Simpson P, Lawlor PG, Stanton C, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF. 2004. *Salmonella* carriage in an Irish pig herd: correlation between serological and bacteriological detection methods. *Journal of Food Protection*, 67: 2797-800.
- Enøe C, Georgiadis MP, Johnson WO. 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, 45:61-81.
- Funk JA, Harris IT, Davies PR. 2005. Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine. *Veterinary Microbiology*, 107: 115-26.
- Gray JT, Stabel TJ, Fedorka-Cray PJ. 1996. Effect of dose on the immune response and persistence of *Salmonella* choleraesuis infection in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 57: 313-19.
- Hald T, Vose D, Wegener HC and Koupeev TA. 2004. Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Analysis*, 24: 255-69.
- Hurd HS, McKean JD, Wesley IV, Karriker LA. 2001. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Journal of Food Protection*, 64: 939-944.
- Mainar-Jaime RC, Atashparvar N, Chirino-Trejo M, Rahn K. 2007a. Survey on *Salmonella* spp infection in slaughter pigs in Saskatchewan by culture and PCR. *Canadian Veterinary Journal* (submitted).
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 840-842.
- Nollet N, Maes D, Duchateau L, Hautekiet V, Houf K, Van Hoof J, De Zutera L, De Kruif A, Geers R. 2005. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Veterinary Research*, 36: 545-55.
- Steinbach G, Hartung M. 1999. Attempt to estimate the share of human *Salmonella* infections, which are attributable to *Salmonella* originating from swine. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 112: 296-300.
- van der Heijden HM. 2001. First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 114: 389-92.