



FACULTAD DE POSGRADOS

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ELISA INDIRECTO Y
FLUORESCENCIA POLARIZADA, PARA DETERMINACIÓN DE
ANTICUERPOS CONTRA LA BRUCELOSIS EN LECHE DE BOVINOS,
DE LOS PREDIOS LUCERITO Y SAN JORGE, CANTÓN MONTUFAR,
PROVINCIA CARCHI.

Autora

Erika Tatiana Montes Velásquez

Año
2018



FACULTAD DE POSGRADOS

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ELISA INDIRECTO Y
FLUORESCENCIA POLARIZADA, PARA DETERMINACIÓN DE
ANTICUERPOS CONTRA LA BRUCELOSIS EN LECHE DE BOVINOS, DE
LOS PREDIOS LUCERITO Y SAN JORGE, CANTÓN MONTUFAR,
PROVINCIA CARCHI.

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Magister en Agroindustria con mención en Calidad y
Seguridad Alimentaria

Docente Guía

Msc. Ligia Estefanía Arizaga Collantes

Autora

Erika Tatiana Montes Velásquez

Año

2018

DECLARACION DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Comparación de los métodos de ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada, para determinación de anticuerpos contra la brucelosis en leche de bovinos, de los predios Lucerito y San Jorge, cantón Montufar, provincia Carchi, a través de reuniones periódicas con la estudiante, Erika Tatiana Montes Velásquez, en el semestre 2019-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Ligia Estefanía Arízaga Collantes
Magister Scientiae Especialidad: Agronegocios
C.C.1714648407

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Comparación de los métodos de ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada, para determinación de anticuerpos contra la brucelosis en leche de bovinos, de los predios Lucerito y San Jorge, cantón Montufar, provincia Carchi, de la estudiante, Erika Tatiana Montes Velásquez, en el semestre 2019-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Pablo Santiago Moncayo Moncayo
Magister Dirección de Operaciones y Seguridad Industrial
C.C.1712367505

DECLARACION DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Erika Tatiana Montes Velásquez
C.C. 171187092-1

AGRADECIMIENTOS

Al Creador de la Vida.

A mi padre, hermanos y tías por su amor y paciencia.

A Cris, Naty y Sandrita por su apoyo. A la Master Estefanía Arízaga por su guía para culminar este proyecto.

DEDICATORIA

A Marco, Mary y María José.
A mis dos Ángeles que están en el
cielo, Mamá y Jesús Enrique .

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la técnica más sensible y específica para el diagnóstico de anticuerpos contra brucelosis en leche de bovinos, y hacer una comparación entre los métodos de ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada.

Este estudio fue una investigación de tipo transversal, descriptiva, para lo cual se recolectaron muestras de leche de las Haciendas Lucerito y San Jorge ubicadas en la provincia del Carchi, las mismas que fueron seleccionadas al azar y tomadas de la base de datos del Laboratorio de Diagnóstico Livexlab Cia. Ltda.

La DSp (Especificidad diagnóstica) de la prueba de ELISA indirecto fue del 72% y se estableció a través del análisis de cincuenta y cuatro muestras de leche de bovinos seronegativos confirmados, obteniendo treinta y nueve animales negativos, catorce animales positivos y un animal sospechoso, estos últimos considerados como falsos positivos.

La DSe (Sensibilidad diagnóstica) de la prueba de ELISA indirecto fue del 100 % y se obtuvo a través del análisis de once muestras de leche de animales seropositivos confirmados, de los cuales se obtuvo once animales positivos.

La DSp de la prueba de Fluorescencia Polarizada fue del 100% y se estableció mediante el análisis de 54 muestras de leche de bovinos seronegativos confirmados, de los cuales se obtuvieron 54 animales negativos.

La DSe de la prueba de Fluorescencia polarizada fue del 100% y se obtuvo a través el análisis de 11 muestras de leche de bovinos seropositivos confirmados, de los cuales se obtuvieron 11 animales.

En el gráfico de la curva ROC para la prueba de ELISA indirecto se obtuvo un valor del área bajo la curva de 0.83, lo que permitió establecer que el ELISA indirecto es una prueba diagnóstica regularmente discriminativa, mientras que en

el gráfico de la curva ROC para la prueba de FPA se obtuvo un área bajo la curva de 0.99, lo que permitió establecer que el FPA es una prueba diagnóstica altamente discriminativa.

La comparación de resultados obtenidos de las pruebas de ELISA indirecto y FPA permitió determinar que la técnica más sensible y específica para la detección de anticuerpos contra brucelosis en leche de bovinos, es la prueba de fluorescencia polarizada FPA, la cual presenta una capacidad de discriminación del 99.58% (área bajo la curva ROC de 0.9958), indicando que dicha prueba es altamente discriminatoria o que permite distinguir claramente entre animales enfermos y no enfermos.

Palabras clave: Brucelosis, FPA, Elisa

ABSTRACT

The aim of this research work is to determine the most sensitive and specific technique for the diagnosis of antibodies against brucellosis in bovine milk, and to make a comparison between the methods of indirect ELISA and Polarized Fluorescence.

This study was a cross-sectional, descriptive research, for which milk samples were collected from the Lucerito and San Jorge farms located in the province of Carchi, which were randomly selected from the database of the Diagnostic Laboratory Livexlab Cia. Ltda.

The DSp (Diagnostic Specificity) of the indirect ELISA test was 72% and was established by the analysis of 54 milk samples from confirmed seronegative animals, obtaining 39 negative animals, 14 positive animals and 1 suspect animal, the latter ones being considered as false positives.

The DSe (Diagnostic Sensitivity) of the indirect ELISA test was 100 % and was obtained by analysis of 11 milk samples from confirmed seropositive animals, from which 11 animals were positive.

The DSp of the Polarized Fluorescence test was 100% and was established by testing 54 milk samples from confirmed seronegative animals, from which 54 negative animals were obtained.

The DSe of the Polarized Fluorescence test was 100% and was obtained by testing 11 milk samples from confirmed seropositive animals, from which 11 animals were obtained.

The graph of the ROC curve for the indirect ELISA test give an outcome of 0.83 for the area under the curve, making it possible to establish that the indirect ELISA is a regularly discriminative diagnostic test. Meanwhile in the graph of

the ROC curve for the FPA test the area under the curve was 0.99, making it possible to establish that the FPA is a highly discriminative diagnostic test.

The comparison of results obtained from the indirect ELISA and FPA tests allowed to determine that the most sensitive and specific technique for the diagnosis of antibodies against brucellosis in bovine milk is the FPA fluorescence polarized test, which has a discrimination capacity of 99.58% (area under the ROC curve of 0.9958), signifying this test is highly discriminatory, this is to say it can clearly distinguish between animals with or without the disease.

Keywords: Brucellosis, ELISA, FPA

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Planteamiento del problema.....	1
1.2.	Objetivos.....	5
1.2.1.	Objetivo General.....	5
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	5
1.3.	Hipótesis.....	5
1.4.	Variables.....	6
1.5.	Justificación de la investigación.....	6
2.	MARCO TEÓRICO.....	10
2.1.	Definiciones.....	10
2.2.	La Brucelosis bovina en el Ecuador.....	10
2.3.	Importancia del diagnóstico temprano de Brucella abortus., a la inocuidad de la leche.....	13
2.4.	Diagnóstico de brucelosis en muestras de leche.....	14
2.5.	Fundamentos de la técnica de ELISA Indirecto.....	15
2.6.	Fundamentos de la Prueba de anillo en leche.....	16
2.7.	Fundamentos de la técnica de Fluorescencia Polarizada.....	17
2.8.	Fundamentos del Cultivo bacteriológico.....	19
2.9.	Especificidad diagnóstica (D _{Sp}):.....	19
2.10.	Sensibilidad diagnóstica.....	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1.	Metodología.....	20
3.2.	Determinación de la muestra.....	21
3.3.	Análisis estadístico.....	22

3.4. Realización de los ensayos diagnósticos para Brucelosis en muestras de leche por la técnica de ELISA indirecto de IDVET de los predios Lucerito y San Jorge	23
3.5. Preparación de las muestras de leche.....	24
3.5.1. Preparación de la solución de lavado	24
3.5.2. Procedimiento de la prueba	24
3.5.3. Interpretación de los resultados.....	28
3.6. Realización de los ensayos diagnósticos para Brucelosis en muestras de leche por la técnica FPA de ELLIE de los predios Lucerito y San Jorge	28
3.6.1. Preparación de las muestras	29
3.6.2. Preparación del diluyente de muestras (25X)	29
3.6.3. Procedimiento de la prueba	29
3.6.4. Criterios de Validación de la prueba.....	32
3.6.5. Cálculos.....	32
3.6.6. Interpretación de la prueba	33
3.7. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los métodos de ELISA indirecto y FPA.	34
3.8. Ingreso de datos en el software Epidat 3.1 para la construcción de la curva ROC.....	36
4. RESULTADOS	36
4.1. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de ELISA indirecto.	36
4.1.1. Especificidad diagnóstica del método de ELISA indirecto	36
4.1.2. Sensibilidad diagnóstica	39
4.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de Fluorescencia Polarizada.	42
4.2.1. Especificidad Diagnóstica del método de Fluorescencia Polarizada.	42

4.3. Construcción de la curva ROC y cálculo del área bajo la curva de los ensayos de ELISA indirecto y Fluorescencia polariza.....	48
4.4. Comparación de las técnicas de ELISA indirecto y fluorescencia Polarizada.....	52
5. DISCUSIÓN	59
5.1. Sensibilidad y especificidad ELISA Indirecto.....	59
5.2. Sensibilidad y especificidad FPA	60
5.3. Curva ROC	60
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
6.1. Conclusiones	62
6.2. Recomendaciones.....	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Índices de rendimiento promedio (PI), desviaciones estándar (SD) y porcentaje de coeficiente de variación (% CV) para pruebas serológicas para brucelosis bovina.....	8
Tabla 2 Determinación de muestras según el límite de confianza y porcentaje de error.....	22
Tabla 3 Interpretación de la prueba de ELISA indirecto	28
Tabla 4 Criterios de validación de la prueba de FPA	32
Tabla 6 Interpretación de la prueba de FPA para animales vacunados con C19	34
Tabla 7 Cuadro de contingencia de dos por dos.	35
Tabla 9 Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica ELISA indirecto IDVET	39
Tabla 10 Cálculos de sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto de IDVET.	41
Tabla 11 Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica FPA ELLIE LLC	43
Tabla 12 Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.....	45
Tabla 13 Cálculos de sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba de FPA de ELLIE LLC.....	47
Tabla 14 Indicadores (VP, FP, VN, FN, DSe, DSp) para la construcción de la curva ROC- técnica de ELISA indirecto de IDVET	49
Tabla 16 Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestras de leche de la hacienda San Jorge y de las pruebas serológicas Rosa de Bengala y ELISA competitivo	53
Tabla 17 Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestra de leche de la hacienda Lucerito y de las pruebas serológicas Rosa de Bengala y ELISA competitivo	54

Tabla 18. Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC, de las muestras de leche positivas tomadas para la determinación de sensibilidad diagnóstica y de las pruebas serológicas Rosa de Bengala y Elisa competitivo..... 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.....	14
Figura 2. Prueba de anillo en leche.....	17
Figura 3. Reacción de la prueba de anillo en leche (PAL)	17
Figura 4.	18
Figura 5. Kit de ELISA indirecto para detección de anticuerpos en leche	24
Figura 7. Template ELISA – Formato de distribución de las pruebas	25
Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de FPA.....	31
Figura 10. Kit de FPA para detección de anticuerpos contra Brucella sp.....	34
Figura 12. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica ELISA indirecto IDVET	38
Figura 13. Porcentaje de animales diagnosticados como positivos en la prueba ELISA indirecto.....	38
Figura 14. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica ELISA indirecto IDVET	39
Figura 16. Especificidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto.....	41
Figura 17. Sensibilidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto	42
Figura 18. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.....	44
Figura 19. Porcentaje de animales diagnosticados como positivos en la prueba FPA.	44
Figura 20. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.....	45
Figura 22.Especificidad diagnóstica de la prueba de FPA	48
Figura 23. Sensibilidad diagnóstica de la prueba de FPA	48
Figura 24. Curva ROC para la técnica de ELISA indirecto de IDVET.	50
Figura 25. Curva ROC para la técnica de FPA de ELLIE LLC.	52
Figura 27. Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestra de leche de la hacienda Lucerito.....	56

Figura 28. Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las haciendas San Jorge y Lucerito.....	56
Figura 30. Comparación de todos los resultados obtenidos de la técnica de ELISA indirecto y FPA.....	60

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

Uno de los problemas más graves de las ganaderías del Ecuador es no poder suministrar su leche a la industria láctea por el diagnóstico de brucelosis en la misma que en algunas ocasiones puede tratarse de un falso positivo es decir que hay presencia de anticuerpos contra la bacteria pero no necesariamente debido a la enfermedad, si no a la vacuna contra *Brucella* sp., que se aplica cuando la ternera tiene entre 3 a 6 meses de edad, que es la edad reglamentaria de vacunación para esta enfermedad y que a pesar de haber transcurrido un tiempo de su aplicación, los anticuerpos vacunales siguen eliminándose por medio de la leche (AGROCALIDAD, 2016).

La brucelosis al ser una enfermedad de reporte obligatorio en Ecuador, y a pesar de existir un Programa a nivel nacional de erradicación contra esta enfermedad coordinado por Agrocalidad, no es de carácter obligatorio que todos los productores de leche estén libres de brucelosis. Esta exigencia viene más por parte de la industria lechera (AGROCALIDAD, 2016).

En el Ecuador se encuentran los dos tipos de vacunas contra la brucelosis bovina, tanto la que es elaborada con la cepa S19 de *B. abortus*, como la que se produce con la cepa RB51 de *Brucella abortus* (AGROCALIDAD, 2016).

La vacuna Cepa 19 se utiliza como una vacuna viva y es catalogada como un referente en vacunas contra brucelosis, y con la que se contrastan el resto de vacunas. Se administra entre los tres y seis meses de edad como una dosis única subcutánea de $5 - 8 \times 10^{10}$ bacterias vivas. Se puede aplicar a bovinos adultos una dosis subcutánea reducida 3×10^8 a 3×10^9 pero hay el riesgo de que en algunos animales generen títulos de anticuerpos persistentes pudiendo ocasionarles abortos y la eliminación de la cepa vacunal con la leche. (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2016)

La vacuna cepa RB51 es utilizada en varios países como la principal vacuna para prevenir la brucelosis en los bovinos, no obstante la eficacia de la cepa RB51 comparada con la cepa 19 es motivo de controversia (OIE, 2016).

Se ha observado que dosis completas de vacuna preparada con cepa RB51 de *B. abortus*, administradas por vía intravenosa a ganado bovino inducen placentitis e infecciones placentarias graves en la mayor parte del ganado vacunado y se produce eliminación con la leche en una parte importante de los animales vacunados. Si se vacunan a vacas gestantes puede producir aborto o aumento de la mortalidad perinatal, por lo que debe evitarse la vacunación con RB51 a este tipo de animales (OIE, 2016).

La vacuna RB51 debe ser administrada en bovinos hembras desde los cuatro meses de edad con una dosis de 1 a $3,4 \times 10^{10}$ microorganismos en 2 mililitros de vacuna aplicada subcutáneamente, se revacuna dependiendo del programa sanitario instaurado en el país a todas las hembras del hato incluidas a las terneras de cuatro meses de edad en adelante. (AGROCALIDAD, 2016).

Otra causa de falsos positivos es la infección en las ubres de la vaca denominada mastitis, cuando esta es causada por enterobacterias, contaminando la leche. El tratamiento para la mastitis es la suministración de antibióticos luego de realizar el análisis de cultivo y antibiograma, para poder determinar el género y la especie de la bacteria causante de la infección y el antibiótico adecuado (Gall, Nielsen, 2004).

El presente estudio se centra en comparar dos técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad: ELISA Indirecto y FPA aplicado concretamente en dos haciendas, Lucerito y San Jorge, ubicadas en la Provincia del Carchi, Cantón Montufar, que vivieron esta problemática a finales del año 2017 y durante el primer cuatrimestre del 2018 (Gall, Nielsen, 2004).

La OIE en su capítulo referente a brucelosis bovina afirma que el ELISA indirecto en muestras de leche es un medio eficaz para tamizar los hatos de

vacas en producción a través del análisis para detección de anticuerpos contra *Brucella* sp., en muestras de leche de tanque, e indica que cuando se obtiene un resultados positivo, se deben realizar pruebas en sangre individual de los bovinos (OIE,2016), lo cual implica un alto costo para el ganadero y una pérdida si se trata de un falso positivo debido a la alta sensibilidad de la prueba (97.9%) versus la especificidad (96.1%), mientras que la técnica de FPA en muestra de leche se caracteriza por tener una alta especificidad (99.2%) y una sensibilidad más baja (88.8%) (Gall, Nielsen, 2004).

La prueba de FPA se considera una herramienta diagnóstica más acertada el momento de monitorear los hatos lecheros esperando resultados más específicos y una baja de falsos positivos lo cual favorecería al productor evitando que incurra en gastos innecesarios. (Nicola & Elena, 2009)

Esta enfermedad representa grandes pérdidas económicas y el sacrificio sanitario o muerte no siempre justificado de bovinos en camales autorizados, debido al diagnóstico de animales falsos positivos. El faenamiento, decomiso e incineración de los órganos como aparato reproductivo, glándulas mamarias y ganglios linfáticos, son unas de las medidas sanitarias para casos positivos de Brucelosis bovina en el Ecuador, las mismas que están indicadas en la Resolución 131 de Agrocalidad, Manual de procedimientos para la prevención y control de brucelosis bovina. (AGROCALIDAD, 2016)

Según la norma NTE INEN 9:2012 define a la leche y leche cruda como:

“Leche: Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo”. (INEN, 2012)

“Leche cruda: Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C)”. (INEN, 2012).

Adicionalmente según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012, dentro de los requisitos físicos químicos de la leche cruda, menciona que la leche de ser negativa para la prueba de anillo en leche, es decir debe tener ausencia de anticuerpos contra brucelosis bovina.

La Brucelosis está considerada como la zoonosis de mayor distribución en el mundo, anualmente se reportan alrededor de 500 mil nuevos casos en humanos a nivel mundial. (AGROCALIDAD, 2016)

La brucelosis es una enfermedad alimentaria y sobre todo ocupacional, dentro del grupo de mayor riesgo que puede adquirir esta enfermedad se encuentran los médicos veterinarios, personal de camales, lecheros y ganaderos. Adicionalmente se encuentran los laboratorista que pueden estar expuestos a especímenes contaminados con *Brucella* sp., en el transcurso de procedimientos de diagnóstico o producción de vacunas. El contagio se puede dar por varias vías, entre ellas el consumo de leche y sus derivados contaminados con *Brucella* sp., la manipulación de los órganos reproductores de animales enfermos, el manejo de fetos abortados y placentas, la manipulación de agujas y en menor probabilidad de persona a persona por transmisión sexual, transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos. (World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health, 2006)

En un estudio realizado en el noroeste de Ecuador (Carchi, Imbabura, Pichincha, Manabí y Esmeraldas) en muestras sanguíneas de 3.733 personas, se encontró un porcentaje de personas con anticuerpos contra *Brucella* sp., de 1.88%. (Ron, 2014)

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Demostrar la técnica más sensible y específica para el diagnóstico de anticuerpos contra brucelosis en leche de bovinos, entre los métodos de ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Realizar los ensayos en leche por las técnicas de ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada para la detección de anticuerpos contra brucelosis bovina.
- Determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de las técnicas de ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada a través del análisis de leche de animales previamente diagnosticados.
- Comparar los resultados de los ensayos en leche por las técnicas de ELISA indirecto y Fluorescencia polarizada para detección de anticuerpos contra brucelosis bovina.

1.3. Hipótesis

H1: La técnica de Fluorescencia Polarizada es más específica que la técnica de ELISA indirecto, para la detección de anticuerpos contra la brucelosis bovina en muestras de leche.

H0: La técnica de Fluorescencia Polarizada no es más específica que la técnica de ELISA indirecto, para la detección de anticuerpos contra la brucelosis bovina en muestras de leche.

1.4. Variables

En este proyecto se manejaron las siguientes variables para cada una de las técnicas que se van a comparar:

Variables dependientes:

V1: Sensibilidad diagnóstica

V2: Especificidad diagnóstica

Variables independientes:

V1: % Error

V2: Nivel de confianza

1.5. Justificación de la investigación

La “brucelosis es el nombre genérico que se aplica a las infecciones, humanas o animales, causadas por distintas especies del género *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*” (OIE, 2016); es conocida tradicionalmente como fiebre ondulante, fiebre del Mediterráneo o fiebre de Malta. Esta enfermedad es una zoonosis que se transmite de animales como bovinos, ovinos y cerdos al humano, afectando a personas de todas las edades y ambos sexos, y las vías de contagio pueden ser por contacto directo o indirecto con animales infectados o sus productos tales como la leche o sus derivados.

En muchos países principalmente desarrollados, se ha logrado la erradicación de esta enfermedad, sin embargo aún queda mucho por hacer ya que quedan regiones en las que persiste la infección en animales domésticos y en consecuencia en la población humana. (World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health, 2006)

La Organización Internacional de Epizootias (OIE), indica que hay una presencia importante de animales infectados en todas las provincias del Ecuador, publicado oficialmente entre los años 2015 a 2017, en su sitio web.

En el Ecuador se utilizan las siguientes técnicas de laboratorio para el diagnóstico de brucelosis en leche: ELISA Indirecto, Prueba de anillo en leche, y el aislamiento de la bacteria *Brucella abortus.*, a través de un cultivo de leche. (AGROCALIDAD, 2016)

La OIE menciona que el ELISA Indirecto es una prueba sensible y específica, y resulta muy útil para testear hatos grandes de ganado bovino, ovino y cabras, sin embargo cuando se obtiene resultados positivos se deben realizar pruebas en sangre en todos los bovinos que se encuentran en el rejo de producción (OIE, 2016).

Respecto a la prueba de anillo en leche o Milk Ring Test, es una opción adecuada cuando no se tiene disponible el ELISA para leche. Sin embargo, esta técnica no es recomendable para leche de pequeños rumiantes, y tampoco para rebaños grandes (>100 terneros lactantes) ya que la sensibilidad de la prueba tiene menos fiabilidad. Otro inconveniente de la prueba de anillo en leche es que se pueden obtener resultados falsos positivos en bovinos a los que se les ha aplicado vacuna contra brucelosis hasta cuatro meses antes de la prueba, en casos de calostro o en casos de infección o inflamación de las ubres como la mastitis (OIE, 2016).

Para el aislamiento de brucelosis mediante cultivo, las muestras más adecuadas son: la leche, secreciones vaginales, fetos abortados, membranas fetales, esperma y líquidos de las artritis o de los higromas. La leche debe recogerse de una manera limpia luego de limpiar con agua y quitar toda la humedad de la ubre, posteriormente desinfectar y sellar los pezones. Es muy importante la desinfección y la buena toma de la muestra de leche ya que de ello dependerá el resultado. El crecimiento suele aparecer luego de 3 a 4 días,

pero no deben descartarse los cultivos hasta que hayan pasado 7 a 10 días (OIE, 2016).

En la tabla 1 se muestran las sensibilidades y especificidades de las diferentes técnicas en leche que se utilizan para diagnosticar brucelosis bovina.

Tabla 1

Índices de rendimiento promedio (PI), desviaciones estándar (SD) y porcentaje de coeficiente de variación (% CV) para pruebas serológicas para brucelosis bovina

Prueba	Número total de muestras testeadas	Promedio de sensibilidad	Promedio de especificidad	Promedio PI	DS	CV %
Cultivo	102	4631	100.0	146.1	N/A	N/A
Anillo en leche	7.328	89.5	74.5	164.0	22.2	13.6
Fluorescencia polarizada en leche	5.580	88.8	99.2	188.0	11.2	6.0
ELISA indirecto en leche	16.921	97.9	96.1	194.0	5.6	2.9
Fluorescencia polarizada en leche de tanque	258	100.0	95.9	195.9	N/A	N/A

Adaptada de Gall, Nielsen, 2004, p.993

El presente trabajo de investigación es un aporte a las técnicas diagnósticas convencionales mencionadas anteriormente que son utilizadas a nivel nacional para detección de anticuerpos en la leche de bovinos, proponiendo el uso de otra técnica: Fluorescencia Polarizada FPA, la cual se fundamenta en el movimiento y rotación de moléculas, mediante el uso de una sustancia

fluorescente (fluorocromo) para marcar una pequeña molécula donde la unión de esta a otra de igual o mayor tamaño puede ser medido a través de su velocidad de rotación y la capacidad de ésta de polarizar o no la luz. FPA es una técnica más rápida y sencilla que un ELISA y tiene una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica para detección de anticuerpos contra brucelosis tanto en suero sanguíneo como en leche.

Se determinará la sensibilidad y especificidad de dos técnicas de laboratorio: ELISA Indirecto y Fluorescencia Polarizada (FPA), el primero con el reactivo de IDVET y el segundo con el reactivo de ELLIE LLC, ambos reconocidos internacionalmente por su calidad.

El kit de ELISA indirecto de IDVET está destinado a la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* o *B. melitensis* en leche de bovinos, ovinos y caprinos. El test puede ser utilizado en leches individuales o mezcla de leches.

La evaluación del diagnóstico de éste kit ELISA en muestras de campo ha demostrado que las muestras de leche bovina positivas pueden ser detectadas en mezclas de hasta doscientas cincuenta leches (IDVET, 2015).

El kit de FPA para *Brucella abortus* es un ensayo cuantitativo que usa la tecnología de Fluorescencia Polarizada, diseñada para determinar la presencia de anticuerpos para *Brucella abortus* en leche y suero bovino. La presencia de anticuerpos es indicativo de una infección previa con *Brucella abortus* o vacunación con una vacuna de cepa lisa tal como la cepa 19. Bovinos vacunados con vacuna de cepa rugosa (por ejemplo, RB51) no reaccionan de forma positiva en la prueba (ELLIE LLC, 2016).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Definiciones

AGROCALIDAD: Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario.

Brucelosis: Patología proveniente de los animales causada por el género *Brucella* sp.

Brucella sp.: Bacilos gram negativos pequeños, inmóviles y aerobios estrictos.

Brucella abortus: Bacilo corto Gram negativo, cuyos factores de virulencia están determinados por la presencia de un lipopolisacárido (LPS) inmunodominante y la capacidad de sobrevivir en el interior de células fagocíticas (patógeno intracelular facultativo).

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FPA: Fluorescencia polarizada.

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Mastitis: Inflamación de la glándula mamaria.

OIE: Organización Mundial de salud animal.

PAL: Prueba de anillo en leche.

WHO / OMS: Organización Mundial de la Salud.

Zoonosis: Enfermedad de los animales que se transmite al ser humano

2.2. La Brucelosis bovina en el Ecuador

La brucelosis es una patología que se transmite de animales vertebrados a los seres humanos, es de distribución mundial y se la conoce desde hace muchos años, no obstante continúa siendo un problema sanitario y económico de gran alcance. Esta enfermedad es producida por bacterias que pertenecen al género *Brucella* sp., que causan problemas de salud significativos entre los individuos que consumen alimentos contaminados o que tienen un estrecho contacto con los bovinos. (Castro, 2005)

El contagio entre animales se produce por el consumo de pastos, alimentos y agua contaminados con *Brucella abortus*, a través de membranas fetales de bovinos infectados y secreciones vaginales que pueden ingresar por vía ocular e incluso a través de la piel intacta de animales que se encuentran dentro de un establo, por contacto con productos de un aborto y machos enfermos, por inseminación artificial realizada sin tomar en cuenta las adecuadas medidas de bioseguridad. (Zambrano, 2016)

La brucelosis bovina causa grandes pérdidas económicas en el país, principalmente por la reducción en la producción de leche, por los abortos de vacas y otras complicaciones de tipo reproductivo, así como el sacrificio de animales infectados, y la restricción de la comercialización internacional de animales o sus productos. (AGROCALIDAD, 2016)

En Ecuador, las pérdidas están estimadas en 5.5 millones de dólares por año. En humanos, esta zoonosis conduce principalmente a pérdidas en el tiempo de trabajo y costos relacionados con el diagnóstico y el tratamiento. En Latinoamérica, cuatro de diez personas viven en áreas donde la brucelosis es endémica en reservorios animales naturales. Sin embargo, la infección en humanos es subestimada y a menudo no se reporta y solo existen pocos informes relativos a la identificación de cepas circulantes de *Brucella* sp. (Ron, 2014)

En el Ecuador, mediante ensayos de diagnóstico con baja sensibilidad, varios autores han informado sobre la presencia de anticuerpos contra *Brucella* sp., principalmente en los mataderos.

De acuerdo con el Ministerio de salud Pública (MSP), solo 111 casos humanos fueron reportados entre 1990 y 2001, mientras que el Instituto Nacional de Estadísticas y censo (INEC), registraron 152 personas hospitalizadas para brucelosis entre 1995 y 2007. (Ron, 2014)

En Ecuador se realizaron estudios acerca del estado de la enfermedad los cuales indican una alta prevalencia de brucelosis; de igual manera, el tamaño de los rebaños es uno de los factores más importantes de riesgo para la presentación de la enfermedad. En otro estudio, realizado en la provincia del Carchi, señalan que la prevalencia de la brucelosis bovina está directamente en relación con la densidad de la población del ganado. (Zambrano, 2016)

La presencia de la Brucelosis en la ganadería ecuatoriana fue evidenciada por Salvestroni, quien en 1926 realizó al parecer la primera notificación de un caso positivo (AGROCALIDAD, 2016).

Una de las problemáticas que se evidenciaban antes de que la entidad sanitaria reguladora, AGROCALIDAD estableciera a través de la resolución DAJ-2013461-0201.0214 del 21 de noviembre de 2013, la declaración obligatoria de cualquier animal positivo o sospechoso a Brucelosis bovina, era la venta entre ganaderos o en ferias de los animales seropositivos lo cual diseminaba la enfermedad.

A raíz del incentivo de un centavo de dólar por litro de leche que obtienen los ganaderos según el acuerdo Ministerial No.136, publicado en el Registro Oficial del 12 de Mayo de 2010, es notorio el interés sanitario de los propietarios del ganado bovino por erradicar de sus predios la brucelosis.

Cabe recalcar que la participación activa del ganadero es imprescindible mediante el conocimiento y cumplimiento de las normas para alcanzar el éxito de la eliminación de la enfermedad (AGROCALIDAD, 2016).

En el manual de procedimientos para la atención y control de brucelosis bovina en el Ecuador de AGROCALIDAD , refiere que se ha establecido el procedimiento a seguir en cuanto a vigilancia epidemiológica, en caso de que se reporten animales sospechosos o positivos confirmados con brucelosis debiendo reportar inmediatamente al sistema de vigilancia del Servicio

Veterinario Oficial, en este caso a la Dirección de Vigilancia Zoonosológica de la Coordinación General de Sanidad Animal de AGROCALIDAD (AGROCALIDAD, 2016).

2.3. Importancia del diagnóstico temprano de *Brucella abortus.*, a la inocuidad de la leche.

La leche y sus derivados son alimentos que se consume a diario a nivel mundial, son una fuente abundante y cómoda de nutrientes cuyo volumen del comercio internacional es considerable. Todos los alimentos tiene la capacidad de transmitir enfermedades y la leche no es la excepción a esta regla debido a su constitución convirtiéndola en un medio apropiado para el crecimiento de microorganismos patógenos (Organización Mundial de la Salud OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2011).

La inocuidad de la leche no solo se refiere a un producto libre de microorganismos patógenos, adicionalmente tiene que estar libre de productos químicos tales como residuos de antibióticos, micotoxinas y plaguicidas. Por lo tanto, el uso de medidas adecuadas para el control de la higiene de la leche, desde el cuidado animal, las adecuadas prácticas de ordeño y el control de toda la cadena alimentaria es fundamental para garantizar la inocuidad de este alimento y su idoneidad para el uso al que se destina (OMS & FAO, 2011).

Según la FAO, OIE y OMS, la mayoría de gente no tiene mayor contacto con animales, pero el mayor potencial de contagio con *Brucella sp.*, es a través del consumo de leche y sus derivados sin pasteurización, debido a que en la leche se elimina una gran cantidad de microorganismos (OMS & FAO, 2011).

Las plantas fabricantes de lácteos tienen la responsabilidad de realizar un control basado en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), para reconocer y controlar los peligros asociados con la materia prima que ingresa a la planta, del mismo modo el productor de leche también debe tener

conocimiento de los peligros relacionados con la leche, para de esta manera ayudar a reducir al mínimo su presencia en la materia prima (OMS & FAO, 2011).

La norma técnica Ecuatoriana NTE INEN 9:2012 Leche cruda. Requisitos, menciona dentro de los requisitos fisicoquímicos que la leche cruda debe tener un resultado negativo a la prueba de anillo en leche PAL, sin embargo (AGROCALIDAD, 2016) en la Resolución 131 refiere que la leche que provenga de animales positivos no es apta para consumo humano a menos que se someta a un proceso de pasteurización.

2.4. Diagnóstico de brucelosis en muestras de leche

La OIE en el capítulo 2.4.1 de Manual Terrestre, menciona que las pruebas en leche de los tanques, el enzima inmuno ensayo indirecto I-ELISA y la prueba de anillo en leche PAL, son un medio eficaz para tamizar los rebaños de ganado lechero.

Para un análisis confiable tanto para cultivo bacteriológico como para detección de anticuerpos, es indispensable realizar una correcta toma de muestra, la leche debe recolectarse de manera aséptica después de lavar y secar toda la ubre y desinfectar los pezones. Es fundamental que las muestras contengan leche de todos los cuartos, se deben tomar 10–20 ml de cada ubre cambiando o desinfectando los guantes entre animales para impedir la contaminación cruzada de las muestras. Los primeros chorros de leche se descartan y la muestra se recolecta directamente en un frasco estéril. Se debe proceder con cuidado de evitar el contacto entre la leche y las manos del lechero (OIE, 2016).

En el caso de cultivo de leche, la crema se puede separar a través de centrifugación, posteriormente la crema y la parte depositada en el fondo se siembran en medio selectivo sólido, por separado o mezclados, o bien se

siembran directamente como se ha indicado previamente. Si en muestras de leche de tanque se detecta *Brucella abortus.*, su número generalmente es muy bajo y el aislamiento a partir de tales muestras es muy poco probable (OIE, 2016).

Para el caso de detección de anticuerpos en leche las muestras pueden tomarse de tanque o de cada animal, y se requerirá de centrifugación o aclaramiento de la muestra, dependiendo el método que se utilice.

A continuación se describen los fundamentos de las técnicas del ELISA Indirecto, Anillo en leche PAL, Fluorescencia Polarizada y cultivo bacteriológico.

2.5. Fundamentos de la técnica de ELISA Indirecto

La técnica de ELISA indirecto consiste en la adhesión del antígeno lipopolisacárido (LPS) sobre una matriz sólida (Microplaca de 96 pocillos), a continuación se añade la dilución de las muestras a analizar y controles y se incuba durante treinta minutos. Posterior al tiempo de incubación, la microplaca se lava y a seguir se añade el anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG1 bovina conjugado con enzima peroxidasa de rábano rústicano. Se incuba nuevamente la placa treinta minutos. El último de la prueba es la adición de la solución Substrato/Cromógeno. Después de un tiempo de diez minutos, la reacción se detiene y se mide en un espectrofotómetro multicanal. (Nicola & Elena, 2009)

Si el suero en análisis tiene anticuerpos anti *Brucella* sp., (suero positivo), estos se unen al antígeno LPS, y al conjugado a la IgG1, luego al agregar la solución substrato/cromógeno se desarrolla un cambio de color cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en la muestra como se muestra en la Figura 1. (Nicola & Elena, 2009)

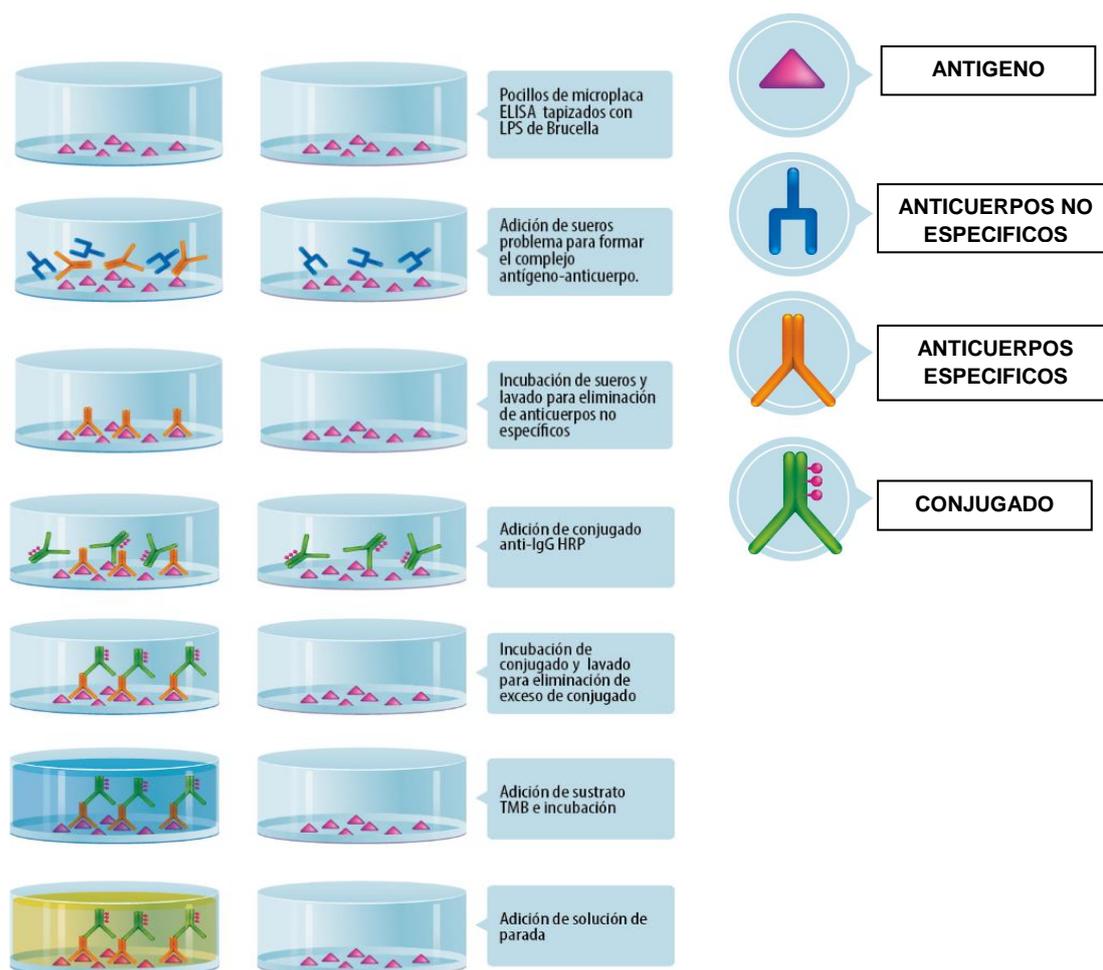


Figura 1. Fundamento del ELISA indirecto

Tomado de: (Hernández & Cabiedes, 2009)

2.6. Fundamentos de la Prueba de anillo en leche

Los anticuerpos presentes en la leche reaccionan con el antígeno coloreado con hematoxilina estableciendo un complejo antígeno anticuerpo que queda adherido a la superficie de los glóbulos grasos y asciende con ellos a la superficie, formando una capa o anillo de crema de color púrpura azulada de intensidad variable según el grado de la reacción. (Nicola & Elena, 2009)

Si la muestra no contiene anticuerpos específicos, el antígeno no se fijará a los glóbulos de grasa y se mantendrá un color uniforme en la columna de leche, y la capa de crema formará un anillo de color blanco en la superficie. La prueba

de PAL “se usa como diagnóstico presuntivo para descubrir rebaños infectados” (Nicola & Elena, 2009) también es usado para vigilancia epidemiológica. Aquellos hatos positivos deberán ser analizados por pruebas serológicas para detectar animales enfermos.

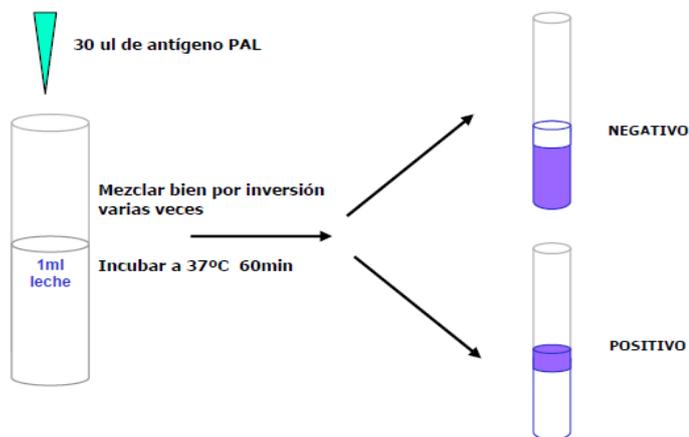


Figura 2. Prueba de anillo en leche

Tomado de: (Nicola & Elena, 2009)

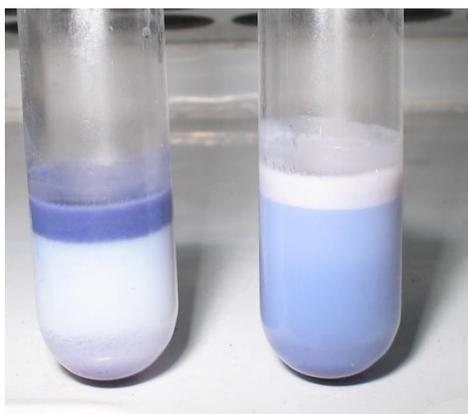


Figura 3. Reacción de la prueba de anillo en leche (PAL)

2.7. Fundamentos de la técnica de Fluorescencia Polarizada

La prueba de Fluorescencia Polarizada (FPA) usa una cadena O-polisacárido (OPS) extraída de *Brucella abortus* conjugada con fluoresceína. El OPS está presente en un lipopolisacárido (LPS) de la bacteria. Durante la prueba, el

conjugado OPS-Fluoresceína se unirá a los Anticuerpos contra *Brucella abortus.*, presentes en la muestra (ELLIE LLC, 2016).

Esta tecnología detecta el tamaño / energía cinética de una molécula o un complejo molecular. Debido a que todos los átomos / moléculas / partículas colisionan unas con otras constantemente, estas tienden a girar. La rapidez del giro está en función del tamaño de la molécula; a mayor el tamaño, menor la velocidad y viceversa. (ELLIE LLC, 2016).

El instrumento de fluorescencia polarizada mide el estado de polarización de la luz emitida por el conjugado OPS. Cuando no existen anticuerpos en la muestra, las moléculas del conjugado OPS giran rápidamente, obteniéndose una baja polarización, mientras que al unirse a los anticuerpos contra *Brucella abortus.*, se crea un complejo molecular de mayor tamaño y menor rapidez de giro, teniendo valores de polarización mayor. (ELLIE LLC, 2016). Figura 2.

La técnica de FPA para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* tiene la capacidad de distinguir animales enfermos con *Brucella abortus*, de los animales vacunados con cepa 19, y de los animales que presentan reacción cruzada con bacterias Gram negativas en más del 90% de los casos. Se puede decir que es comparable en su desempeño con la técnica de ELISA competitivo. (Nicola & Elena, 2009)



A.

B.

Figura 4. A. Fragmento de polisacárido de cadena O de *Brucella abortus.*, conjugado con un fluoróforo. B. Complejos antígeno / fluoróforo unidos a un anticuerpo

2.8. Fundamentos del Cultivo bacteriológico

El cultivo se denomina al proceso de desarrollar los microorganismos de forma intencional, proporcionándoles las condiciones ambientales adecuadas y controladas para su crecimiento como la temperatura y tiempo. (Junco & Rodriguez, 2001)

El aislamiento bacteriológico de *Brucella abortus.*, es lento, caro y complejo, pero debe realizarse siempre que sea posible con la finalidad de determinar la especie y biovariedad de *Brucella abortus.*, que está causando la enfermedad. Se pueden utilizar algunos tipos de medios para el aislamiento entre ellos:

- “Medios basales: El aislamiento y cultivo directo de *Brucella abortus.*, se realiza en un medio sólido. Este método es el más satisfactorio ya que permite el crecimiento y aislamiento de las colonias y se logra reconocerlas claramente” (OIE, 2016).
- Para el aislamiento de *Brucella abortus.*, de muestras de leche, sangre u otros líquidos corporales, “se aconseja un cultivo de enriquecimiento, un medio bifásico no selectivo, como el medio de Castañeda” (OIE, 2016).
- Medios selectivos: Los medios selectivos son los medios basales pero con la adición de antibióticos adecuados para impedir el crecimiento de microorganismos diferentes a *Brucella abortus.* (OIE, 2016).

2.9. Especificidad diagnóstica (D_{Sp}):

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de obtener un resultado negativo (OIE, 2014).

2.10. Sensibilidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica “es la probabilidad de que la respuesta resulte positiva cuando en la muestra estudiada está realmente presente el sustrato de interés en el límite de detección o por arriba de él” (OIE, 2016).

La comparación de un error del 5% frente a un error del 2% presenta una considerable disminución en el número de muestras necesarias. Para lograr una confianza alta (habitualmente del 95%) en las estimaciones de DSe o DS_p se requieren numerosas muestras cuando se desea un margen de error pequeño en la estimación (OIE, 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología

El presente estudio fue una investigación de tipo transversal, descriptiva, para lo cual se recolectaron muestras de leche de dos haciendas seleccionadas al azar, de la base de datos del Laboratorio de Diagnóstico Livexlab, las cuales están registradas como productoras de leche de la provincia del Carchi. Se recolectaron veinte y cuatro muestras de leche de la Hacienda San Jorge y treinta muestras de la Hacienda Lucerito, con la finalidad de detectar anticuerpos contra la brucelosis bovina de estos grupo de animales a través de dos métodos diagnósticos como son la ELISA indirecto y el FPA, para posteriormente proceder a la comparación de sus resultados. Las muestras de leche fueron recolectadas en un solo día por cada hacienda y llevadas inmediatamente al laboratorio para su respectivo análisis.

Los resultados obtenidos en los ensayos fueron clasificados e ingresados a un cuadro de contingencia de dos por dos para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica, adicionalmente se construyó una curva ROC utilizando el software estadístico Epidat 3.1 y así calcular el área bajo la curva la cual permitió determinar cuál es el mejor método diagnóstico.

Para construir la curva ROC se establecieron para la técnica de ELISA indirecto de IDVET puntos de corte en un rango de cinco a trescientos cincuenta SP (Porcentaje de positividad de la muestra), el cual es el rango de funcionamiento del kit, partiendo del punto de corte dado por la casa comercial (cuarenta y cinco, 45), y dando valores superiores e inferiores (Tabla 14).

Para el caso de la técnica de FPA de ELLIE LLC, se estableció un rango de cinco a cien ΔmP (Delta mili polarizaciones), el cuál es el rango de funcionamiento del kit, partiendo del menor punto de corte dado por la casa comercial (diez), y dando valores superiores e inferiores. Cabe recalcar que esta prueba diagnóstica establece dos puntos de corte según la vacuna que se haya aplicado en los bovinos, siendo para la vacuna RB51 de diez ΔmP y para la vacuna de cepa 19 de cuarenta ΔmP , por lo tanto se tomó como referencia el menor de estos (Tabla 15).

3.2. Determinación de la muestra

Para el estudio primero se seleccionaron las haciendas de las cuales fueron tomadas las muestras, haciendas que sean negativas confirmadas a *Brucella abortus* y que a la vez utilicen vacunas como la RB51 o cepa 19, (haciendas San Jorge y Lucerito), además también se seleccionó una granja donde se conozca que existen animales positivos confirmados a *Brucella abortus*.

La determinación del número de muestras tanto para la sensibilidad y especificidad diagnóstica, se realizó en base a la tabla 2, donde el número de muestras establecidas depende de la sensibilidad y especificidad diagnóstica estimada (90% al 99%), del nivel de confianza (90%, 95% ó 99%) y del porcentaje de error (2% y 5%).

Para el presente estudio la sensibilidad diagnóstica (DSe) estimada fue del 99% y la especificidad diagnóstica (DSp) estimada fue del 98%. El nivel de confianza seleccionando fue del 99% para la DSp y del 90% para la DSe, cabe recalcar que se estimó un nivel de confianza más bajo para el caso de la DSe, debido a la difícil obtención de muestras de animales verdaderos positivos, ya que estos animales son sacrificados por la autoridad sanitaria una vez que se conoce el diagnóstico. El porcentaje de error escogido fue del 5% para ambos indicadores. Por lo tanto en el caso de la especificidad diagnóstica se tomaron al azar 52 muestras ± 2 , y para la sensibilidad diagnóstica se tomaron 11 muestras ± 2 .

Las muestras que se procesaron para la sensibilidad diagnóstica no pertenecen a las haciendas San Jorge y Lucerito, ya que para la determinación de este parámetro se requieren de muestras francas POSITIVAS, las mismas que fueron confirmadas por la técnica de ELISA competitivo para determinación de anticuerpos contra brucelosis.

Tabla 2

Determinación de muestras según el límite de confianza y porcentaje de error.

Estimación de DSe o DS _p	2% de error permitido en la estimación de la DSe y la DS _p			5% de error permitido en la estimación de la DSe y la DS _p		
	Confianza			Confianza		
	90%	95%	99%	90%	95%	99%
90%	610	864	1493	98	138	239
92%	466	707	1221	75	113	195
94%	382	542	935	61	87	150
95%	372	456	788	60	73	126
96%	260	369	637	42	59	102
97%	197	279	483	32	45	77
98%	133	188	325	21	30	52
99%	67	95	164	11	15	26

Tomado de: (OIE, 2014)

3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los análisis de las 52 muestras negativas y de las 11 muestras positivas fueron clasificados en base al punto de corte de cada prueba en: verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos, con estos resultados se calculó la sensibilidad diagnóstica (cociente entre los verdaderos positivos (VP) y el total de animales enfermos) y especificidad diagnóstica (cociente de los verdaderos negativos (VN) entre el total de no enfermos) de las muestras en estudio según las ecuaciones 3 y 4.

Con un error del 5% y un nivel de confianza del 90% para la sensibilidad y 99% para la especificidad, se compararon los datos de cada parámetro (sensibilidad diagnóstica y especificidad diagnóstica) para la prueba de ELISA indirecto y de FPA utilizando como estadística descriptiva gráficas de pasteles y de

columnas en Excel. Luego se realizó la representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad mediante la curva ROC utilizando el Software estadístico Epidat 3.1 , en diferentes puntos de corte, graficando en el eje “Y” los verdaderos positivos (sensibilidad) y en el eje “X” los falsos positivos (1-especificidad). Finalmente se calculó el área bajo la curva de cada prueba utilizando el Software estadístico Epidat 3.1 para determinar la probabilidad de que un animal enfermo y uno sano, sean clasificados correctamente, adicionalmente se calculó el índice de Youden para determinar el punto de corte más óptimo de cada prueba.

3.4. Realización de los ensayos diagnósticos para Brucelosis en muestras de leche por la técnica de ELISA indirecto de IDVET de los predios Lucerito y San Jorge

El kit de IDVET, ID Screen Brucellosis Milk indirect, ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* o *melitensis* en leche de rumiantes, viene provisto con los siguientes reactivos:

- Microplacas sensibilizadas con el LPS de *Brucella* sp., (12 tiras x 8 pocillos)
- Conjugado concentrado (10 X)
- Control positivo
- Control negativo
- Diluyente 3
- Solución de concentrado (20X)
- Solución de revelado (TMB)
- Solución de parada (0.5M)

Colocar todos los reactivos a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de ser utilizados y homogenizarlos por vortex o por inversión. (IDVET, 2015)

3.5. Preparación de las muestras de leche

Centrifugar cada muestra de leche o dejarla reposar con la finalidad de separar la crema del lactosuero (crema en la parte superior, lactosuero en la parte inferior), la muestra se toma por debajo de la crema, es decir se toma el lactosuero ya que en este se encuentran los anticuerpos. (IDVET, 2015)

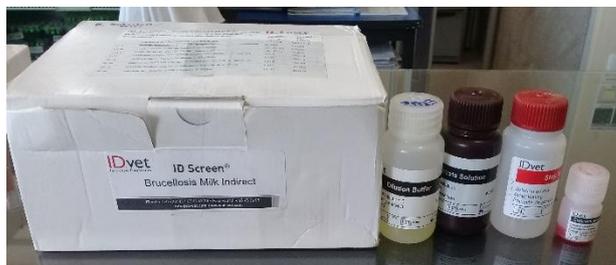


Figura 5. Kit de ELISA indirecto para detección de anticuerpos en leche



Figura 6. Lector de ELISA multicanal para la lectura de la prueba de ELISA indirecto en leche.

3.5.1. Preparación de la solución de lavado

La solución de lavado concentrada (20X), debe estar a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) y se prepara diluyendo 1:20 en agua destilada. (IDVET, 2015)

3.5.2. Procedimiento de la prueba

Para la distribución de los controles y muestras en las placas de ELISA sensibilizadas con el LPS de *Brucella* sp., se utilizó la plantilla de la figura 7, Template ELISA- Formato de distribución de las pruebas.

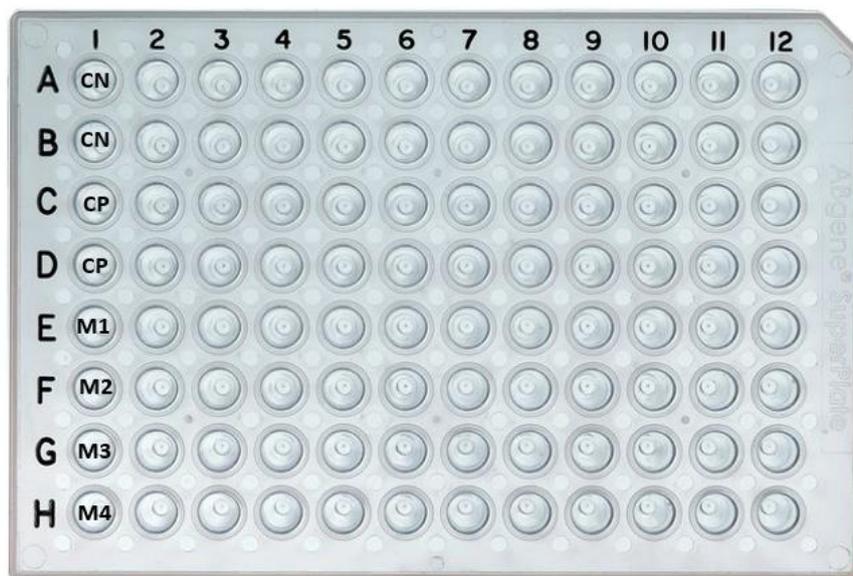


Figura 7. Template ELISA – Formato de distribución de las pruebas

CP = Control Positivo

CN = Control negativo

M = Muestra

- Distribuir cien microlitros (100 ul) de Control negativo en los pocillos A1 y B1. (IDVET, 2015)
- Distribuir cien microlitros (100 ul) de Control positivo en los pocillos C1 y D1. (IDVET, 2015)
- Distribuir cien microlitros (100 ul) de cada muestra a analizar en cada uno de los pocillos restantes. (IDVET, 2015)
- Incubar por 45 minutos \pm 4 minutos a 21°C (\pm 5°C) (incubación corta), o entre 16 y 20 horas a 4°C (\pm 2°C) (incubación nocturna). (IDVET, 2015)
- Lavar tres veces cada pocillo con aproximadamente trescientos microlitros (300 ul) de solución de lavado. Evitar el desecamiento de los pocillos entre lavados. Tener cuidado que no hayan restos de grasa de la leche (circulo blanco) en los pocillos después del lavado. Para evitar los residuos grasosos, es posible dejar un tiempo de contacto de 2 a 5 minutos entre cada lavado. (IDVET, 2015)
- Preparar el conjugado (1X) diluyendo el conjugado concentrado (10X) 1:10 en el Diluyente 3 para la incubación corta, o a 1:20 para la incubación nocturna en el Diluyente 3. (IDVET, 2015)

- Distribuir cien microlitros (100 ul) del conjugado 1X a todos los pocillos. (IDVET, 2015)
- Incubar 30 minutos ± 3 minutos a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$). (IDVET, 2015)
- Lavar tres veces cada pocillo con aproximadamente trescientos microlitros (300 ul) de solución de lavado. Evitar el desecamiento de los pocillos entre lavados. (IDVET, 2015)
- Distribuir cien microlitros (100 ul) de solución de revelado (TMB) en cada pocillo. (IDVET., 2015)
- Incubar 15 minutos ± 2 minutos a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) en la oscuridad. (IDVET., 2015)
- Distribuir cien microlitros (100 ul) de solución de parada en cada pocillo para detener la reacción. (IDVET., 2015)
- Leer la placa en un lector de ELISA multicanal a una densidad óptica de 450 nanómetros. (IDVET., 2015)
- Una vez que se obtuvieron los resultados de las densidades ópticas a 450 nm tanto de los controles como de las muestras, se verificó que el test sea válido, teniendo que cumplir la siguiente condición:
 1. El valor medio de la densidad óptica de los controles positivos es superior a 0.350 nm, $DO_{CP} > 0.350$. (IDVET, 2015)
 2. El cociente entre la media de los controles positivos (DO_{CP}) y la media de los controles negativos (DO_{CN}) es superior a tres. (IDVET, 2015)
- Una vez que se verificó que el test fue válido, se procedió a realizar los cálculos para obtener los porcentajes SP (Porcentaje de positividad de la muestra) mediante la Ecuación 1:

$$\%SP = \frac{DO \text{ muestra} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

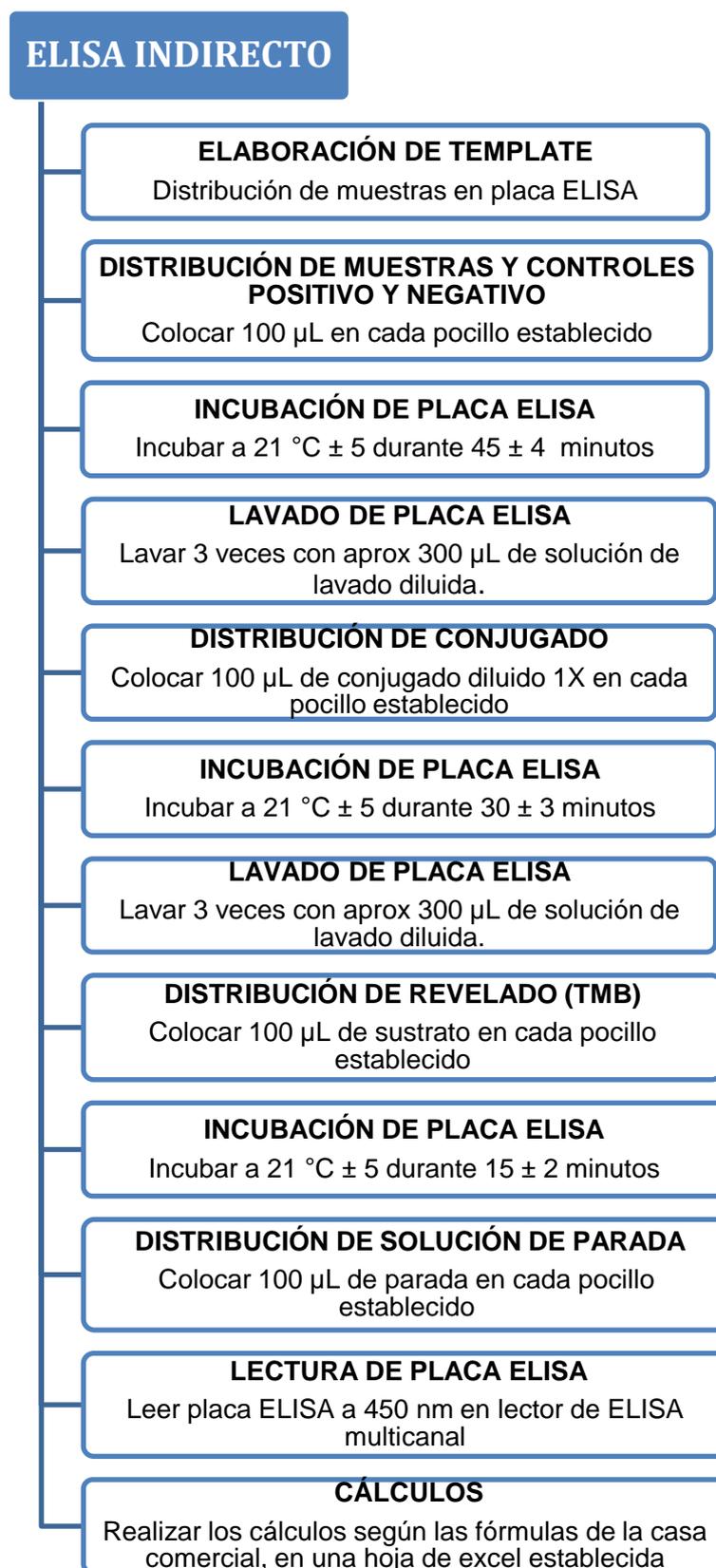


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso del ELISA indirecto.

3.5.3. Interpretación de los resultados

La interpretación de la prueba de ELISA indirecto se basa en el cumplimiento de las siguientes condiciones indicadas en la tabla 3.

Las muestras que presentan un SP (Porcentaje de positividad de la muestra) inferior o igual a 45% son consideradas como negativas. (IDVET, 2015)

Las muestras con un SP (Porcentaje de positividad de la muestra) superior a 45% e inferior o igual a 50% son consideradas dudosas. (IDVET, 2015)

Las muestras con un SP (Porcentaje de positividad de la muestra) superior a 50% son consideradas como positivas. (IDVET, 2015)

Tabla 3

Interpretación de la prueba de ELISA indirecto

Resultado	Estatus
SP % \leq 45%	Negativo
45% < SP % \leq 50%	Dudoso
SP % > 50%	Positivo

Tomado de: (IDVET, 2015)

3.6. Realización de los ensayos diagnósticos para Brucelosis en muestras de leche por la técnica FPA de ELLIE de los predios Lucerito y San Jorge

Antes de utilizar los reactivos ponerlos a $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante dos horas y homogenizarlos agitando moderadamente. Las muestras de leche requieren de una preparación previa antes de ser analizada, la misma que se detalla a continuación.

3.6.1. Preparación de las muestras

Las muestras de leche entera pueden dejarse refrigeradas por 24 horas antes de su procesamiento o centrifugarlas durante 10 minutos para separar los lípidos existentes. Recolectar la leche descremada y clarificar con el reactivo ClearMilk™ Buffer, añadiendo 500 ul de la leche desgrasada y 30 ul del reactivo, incubar de 5 a 30 minutos a $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, dependiendo de la aglutinación de la muestra. Finalmente, centrifugar entre 4000 – 5000 rpm durante 15 minutos o entre 12 a 15000 rpm por 5 minutos para obtener la leche clarificada, la cual se separó en un tubo eppendorf con su respectiva identificación. (ELLIE LLC, 2016)

3.6.2. Preparación del diluyente de muestras (25X)

- Verificar que el diluyente de muestras esté libre de partículas. Si el diluyente presenta algún cristal calentar hasta 37°C para disolverlos y luego llevar a temperatura ambiente para su uso. (ELLIE LLC, 2016)
- Mezclar 1 parte del Diluyente de Muestra 25X con 24 partes de agua destilada o desionizada. Ejemplo: 1ml de diluyente de muestras 25X en 24 ml de agua destilada tipo II y mezclar. (ELLIE LLC, 2016)

3.6.3. Procedimiento de la prueba

- Identificación de los tubos de muestras y controles.
- Colocar 1ml del diluyente 1X de muestras preparado en cada tubo. (ELLIE LLC, 2016)
- Añadir 20 μl de muestras y controles en sus respectivos tubos. Los controles Negativos se correrán por triplicado. (ELLIE LLC, 2016)
- Los controles se deben repetir después de cada 60 muestras. (ELLIE LLC, 2016)
- Mezclar con cuidado evitando hacer burbujas al pipetear en los tubos. (ELLIE LLC, 2016)

- Incubar durante 3-30 minutos a $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. (ELLIE LLC, 2016)
- Realizar la lectura en el equipo de FPA de blancos de todas las muestras y controles con un filtro de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm. (ELLIE LLC, 2016)
- Añadir 10 μl de Conjugado (Tracer) en todos los tubos que contengan controles y muestras. (ELLIE LLC, 2016)
- Mezclar con cuidado en vortex evitando hacer burbujas al pipetear en los tubos. (ELLIE LLC, 2016)
- Incubar durante 3-5 minutos a $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. (ELLIE LLC, 2016)
- Realizar la lectura en el equipo de FPA del tracer de todas las muestras y controles con un filtro de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm. (ELLIE LLC, 2016)
- Calcular los resultados en una hoja de cálculo en EXCEL diseñada específicamente para la prueba de *Brucella abortus.*, por la técnica de FPA.

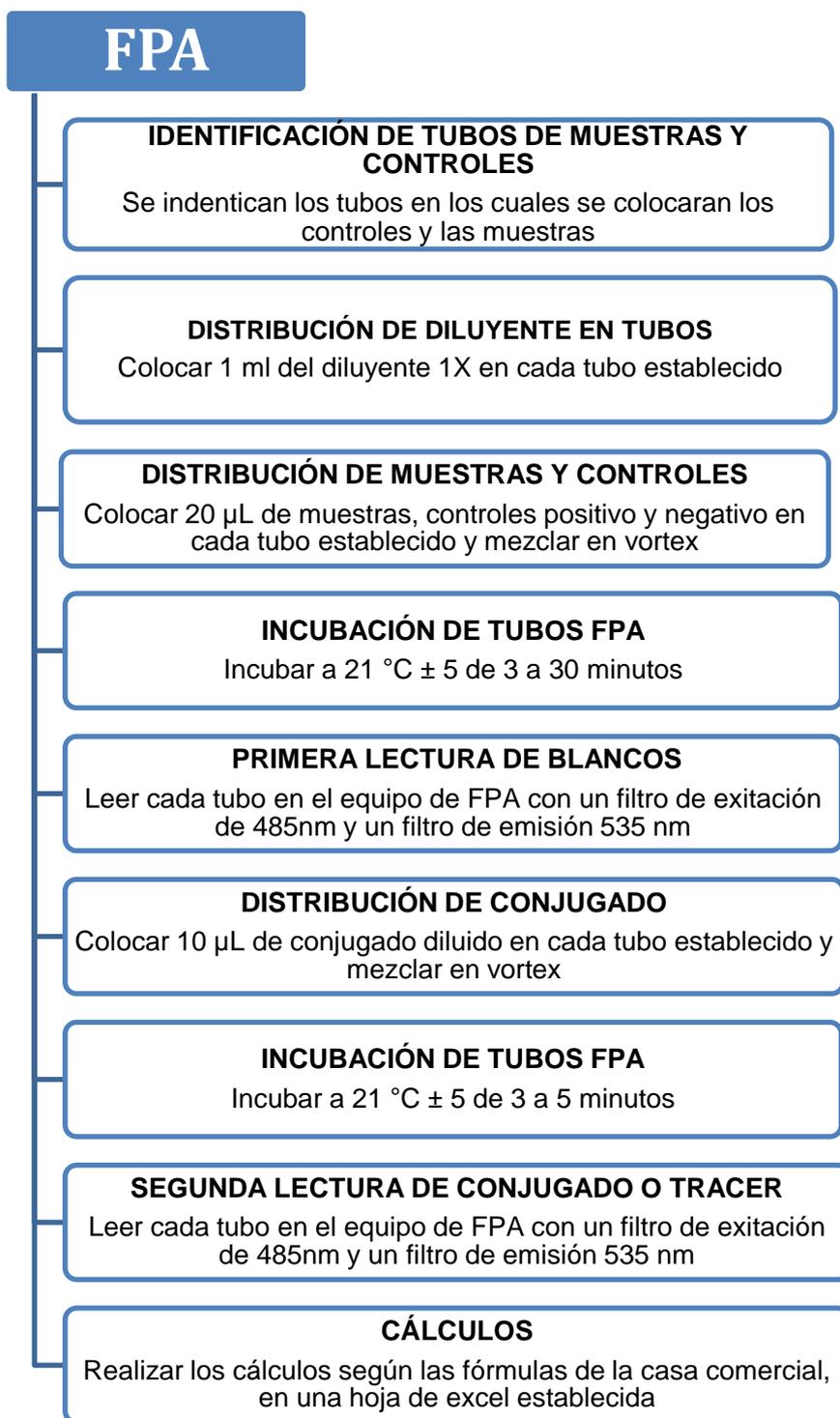


Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de FPA.

3.6.4. Criterios de Validación de la prueba

El test es válido si los controles se encuentran dentro de los límites expuestos en la tabla 4.

Tabla 4

Criterios de validación de la prueba de FPA

mP	VALOR
mP Control negativo	70-90
mP Control Positivo	120-250

Tomado de: (ELLIE LLC, 2016)

En caso de que el Control Negativo esté fuera del rango, se debe ajustar el Factor-G, para obtener un mP de 80 ± 5 . (ELLIE LLC, 2016)

Si el mP del control negativo se ajusta, y el mP del control positivo está fuera del rango, la prueba se considera inválida. (ELLIE LLC, 2016)

Si el ΔmP de la muestra es inferior a -15 se debe tomar una nueva muestra. (ELLIE LLC, 2016)

Tanto el valor del mP como el ΔmP de los controles Positivos y Negativos pueden variar según el número de lote, por lo que se recomienda verificar estos valores en el inserto que viene en cada kit.

3.6.5. Cálculos

El ΔmP de cada muestra se obtiene realizando el siguiente cálculo:

$$\Delta mP = mP \text{ de muestra} - \text{promedio de mP del control negativo} \quad (\text{Ecuación 2})$$

3.6.6. Interpretación de la prueba

Los resultados para muestras de leche de animales con vacuna RB51 o sin vacuna se interpretarán de acuerdo a la tabla 5 y para Cepa 19 en la tabla 6.

Las muestras de animales vacunados con RB51 o sin vacuna, que salgan positivas y sospechosas se deben volver a analizar por duplicado. Si ambas repeticiones leen igual o menos (\leq) que 10 Δ mP, la muestra se informa como Negativa. Si alguna de las repeticiones es mayor ($>$) que 20 Δ mP, la muestra se informa como Positiva. (ELLIE LLC, 2016)

Si los valores de Δ mP continúan como mayores ($>$) a 10 y menores o iguales (\leq) a 20, la muestra se informa como Sospechosa. (ELLIE LLC, 2016)

Tabla 5

Interpretación de la prueba de FPA para animales vacunados con RB51 o sin vacuna

Valor de ΔmP	Interpretación
Δ mP $>$ 20	POSITIVO
Δ mP 10-20	SOSPECHOSO
Δ mP \leq 10	Negativo

Tomado de: (ELLIE LLC, 2016)

Las muestras de animales vacunados con Cepa 19 que salgan positivas y sospechosas se deben volver a analizar por duplicado. Si ambas repeticiones leen igual o menos (\leq) que 40 Δ mP, la muestra se informa como Negativa. Si alguna de las repeticiones es mayor ($>$) que 60 Δ mP, la muestra se informa como Positiva. (ELLIE LLC, 2016)

Si los valores de Δ mP continúan como mayores ($>$) a 40 y menores o iguales (\leq) a 60, la muestra se informa como Sospechosa. (ELLIE LLC, 2016)

Tabla 6

Interpretación de la prueba de FPA para animales vacunados con C19

Valor de ΔmP	Interpretación
$\Delta mP > 60$	POSITIVO
$\Delta mP 40-60$	SOSPECHOSO
$\Delta mP \leq 40$	Negativo

Tomado de: (ELLIE LLC, 2016)

Los valores de corte pueden variar de un país a otro, para diferentes usos o estado de vacunación de los animales.



Figura 10. Kit de FPA para detección de anticuerpos contra *Brucella sp.*



Figura 11. Equipo de FPA

3.7. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los métodos de ELISA indirecto y FPA.

Los resultados de animales positivos y negativos obtenidos luego de realizar los cálculos de las pruebas, se contabilizan y se ingresan en un cuadro de contingencia de dos por dos como se indica en la tabla 7. Cabe recalcar que

estos animales han sido diagnosticados previamente como sanos o enfermos por el análisis de sueros mediante otra técnica (ELISA competitivo), lo cual permitió clasificar a los animales en estudio como verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos.

Tabla 7

Cuadro de contingencia de dos por dos.

CUADRO DE CONTINGENCIA			
	Presente	Ausente	TOTAL
Positivos	A	B	G=A+B
Negativos	C	D	H=C+D
TOTAL	A+C	B+D	A+B+C+D

A= Verdaderos positivos

B= Falsos positivos

C= Falsos negativos

D= Verdaderos negativos

Tomado de: (OIE, 2014)

Luego se calculó la especificidad diagnóstica mediante la siguiente ecuación:

$$DSp = \frac{VN}{VN+FP} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Y la sensibilidad diagnóstica con la siguiente ecuación:

$$Dse = \frac{VP}{VP+FN} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Los cálculos para sensibilidad y especificidad diagnóstica se encuentran en las tablas 10 y 13.

3.8. Ingreso de datos en el software Epidat 3.1 para la construcción de la curva ROC

En el Software Epidat 3.1 se seleccionaron la pestaña de métodos, pruebas diagnósticas, curvas ROC, simples; en la pestaña origen de datos seleccionamos tablas de dos por dos, posteriormente establecemos el nivel de confianza, el número de tablas que en este caso equivale al número de puntos de corte establecidos para la construcción de la curva ROC, finalmente se ingresaron los resultados obtenidos como verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos para cada punto de corte. Una vez finalizados los ingresos pasamos a la pestaña de resultados y el software arrojó la curva ROC y el valor del área bajo la curva.

4. RESULTADOS

Los resultados de los análisis se muestran en las siguientes tablas

4.1. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de ELISA indirecto.

4.1.1. Especificidad diagnóstica del método de ELISA indirecto

La especificidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto se estableció mediante el análisis de cincuenta y cuatro muestras de leche de animales seronegativos confirmados o también llamados verdaderos negativos, de las haciendas “San Jorge” y “Lucerito (Tabla 8), por lo tanto se esperaba que los resultados obtenidos mediante esta prueba fueran negativos pero se pudo evidenciar que solo treinta y nueve animales fueron negativos. Los otros quince animales fueron falsos positivos, entre ellos catorce animales positivos y un animal sospechoso (Figura 12).

Tabla 8

Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica
ELISA indirecto IDVET.

ELISA INDIRECTO			
Nº	IDENTIFICACION	S/P ELISA INDIRECTO	RESULTADO ELISA INDIRECTO
1	LG-1	10,23	Negativo
2	LG-2	4,16	Negativo
3	LG-3	8,87	Negativo
4	LG-4	10,05	Negativo
5	LG-5	15,03	Negativo
6	LG-6	4,89	Negativo
7	LG-7	2,99	Negativo
8	LG-8	13,40	Negativo
9	LG-9	17,29	Negativo
10	LG-10	19,74	Negativo
11	LG-11	37,57	Negativo
12	LG-12	73,65	POSITIVO
13	LG-13	6,13	Negativo
14	LG-14	29,70	Negativo
15	LG-15	3,98	Negativo
16	LG-16	10,68	Negativo
17	LG-18	11,05	Negativo
18	LG-19	11,32	Negativo
19	LG-20	7,88	Negativo
20	LG-21	16,57	Negativo
21	LG-22	8,78	Negativo
22	LG-23	6,16	Negativo
23	LG-24	13,13	Negativo
24	LG-25	21,82	Negativo
25	RP-1	18,19	Negativo
26	RP-2	31,30	Negativo
27	RP-3	20,15	Negativo
28	RP-4	40,21	Negativo
29	RP-5	140,08	POSITIVO
30	RP-6	83,55	POSITIVO
31	RP-7	189,48	POSITIVO
32	RP-8	36,29	Negativo
33	RP-9	9,27	Negativo
34	RP-10	9,01	Negativo
35	RP-11	173,79	POSITIVO
36	RP-12	150,16	POSITIVO
37	RP-13	50,82	POSITIVO
38	RP-14	47,35	SOSPECHOSO
39	RP-15	200,45	POSITIVO
40	RP-16	37,98	Negativo
41	RP-17	111,37	POSITIVO
42	RP-18	25,95	Negativo
43	RP-19	31,12	Negativo
44	RP-20	217,83	POSITIVO
45	RP-21	39,95	Negativo
46	RP-22	81,59	POSITIVO
47	RP-23	40,12	Negativo
48	RP-24	125,19	POSITIVO
49	RP-25	60,19	POSITIVO
50	RP-26	18,19	Negativo
51	RP-27	27,02	Negativo
52	RP-28	31,30	Negativo
53	RP-29	21,40	Negativo
54	RP-30	101,56	POSITIVO

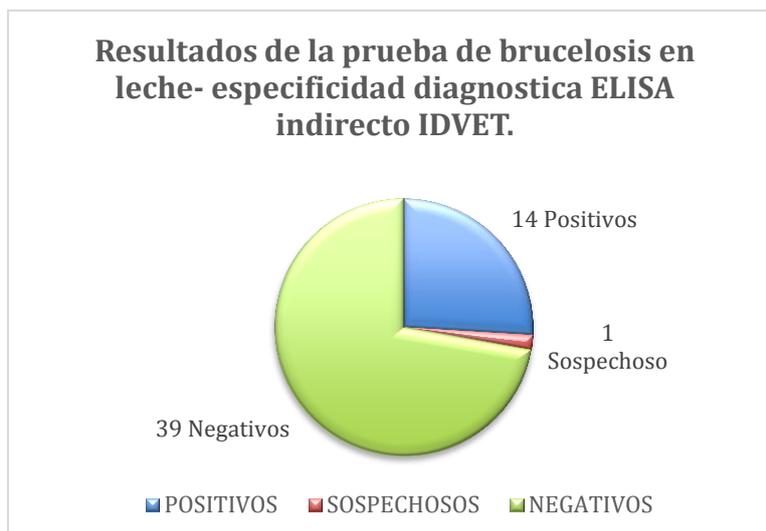


Figura 12. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica ELISA indirecto IDVET

Se conoce mediante la prueba de ELISA competitivo para brucelosis que la población de este grupo de cincuenta y cuatro animales es 100% negativa, por lo tanto se esperaba que el porcentaje de animales positivos sea del 0%, contrario a esto, se evidencia que el 28% de los animales fueron diagnosticados como positivos y sospechosos y solo el 72% como negativos como se puede observar en la figura 13.

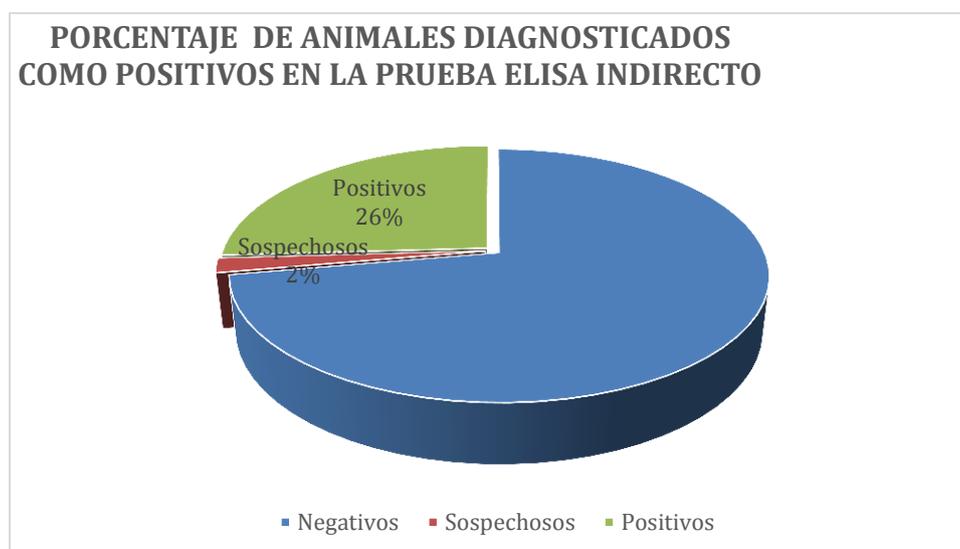


Figura 13. Porcentaje de animales diagnosticados como positivos en la prueba ELISA indirecto

4.1.2. Sensibilidad diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto se estableció mediante el análisis de once muestras de leche de animales seropositivos confirmados o calificados como verdaderos positivos (Tabla 9). Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la prueba de ELISA indirecto, corrobora los resultados de estas muestras analizadas, siendo positivos los once animales (Figura 14).

Tabla 9

Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica ELISA indirecto IDVET

ELISA INDIRECTO			
N°	IDENTIFICACION	S/P ELISA INDIRECTO	RESULTADO ELISA INDIRECTO
1	LE-1705	102,58	POSITIVO
2	LE-173	113,72	POSITIVO
3	LE-176	204,26	POSITIVO
4	LP-LA HERRA	258,76	POSITIVO
5	LC-1	325,12	POSITIVO
6	LC-2	97,60	POSITIVO
7	LEC-170	100,14	POSITIVO
8	LEC-174	86,56	POSITIVO
9	LEC-177	84,74	POSITIVO
10	LEC-178	104,66	POSITIVO
11	LEC-180	278,50	POSITIVO

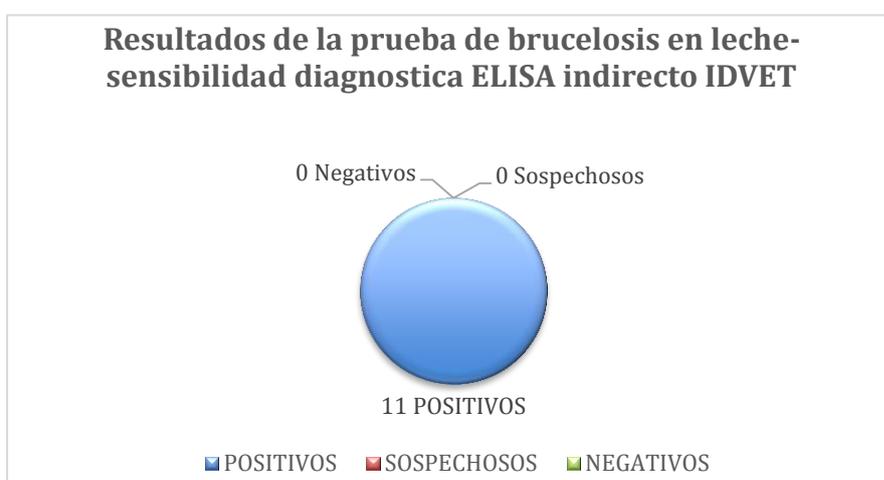


Figura 14. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica ELISA indirecto IDVET

El 100% de los animales en estudio (once), son verdaderos positivos confirmados por la técnica de Elisa competitivo y cultivo bacteriológico, por lo tanto el porcentaje de animales diagnosticados como negativos por la técnica de ELISA indirecto debería ser del 0%, esto se pudo evidenciar en los resultados obtenidos en dicha prueba .(Figura 15).



Figura 15. Porcentaje de animales diagnosticados como negativos en la prueba ELISA indirecto

Los valores de la especificidad y la sensibilidad diagnóstica con respecto al punto de corte (S/P 45) establecido por la casa comercial IDVET, fueron calculados con los resultados obtenidos de la población de animales negativos (cincuenta y cuatro) y de la población de animales positivos (once) e ingresados en el cuadro de dos por dos, como se indica en la tabla 10. Los resultados obtenidos fueron: once animales verdaderos positivos, quince falsos positivos, treinta y nueve verdaderos negativos y cero falsos negativos sumando un total de sesenta y cinco animales analizados para la prueba de ELISA indirecto.

Tabla 10

Cálculos de sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto de IDVET.

	Cantidad de muestras de referencia necesarias			TOTAL
	Que se sabe que son positivas (11)	Que se sabe que son negativas (54)		
Positivos	11	VP	FP	15
Negativos	0	FN	VN	39
TOTAL	11			54

PARÁMETRO	ECUACIONES	VALOR	RESULTADO	UNIDAD
Dse	$Dse = \frac{VP}{VP + FN}$ $Dse = \frac{11}{11 + 0}$	1,00	100	(%)
DSp	$DSp = \frac{VN}{VN + FP}$ $DSp = \frac{39}{39 + 15}$	0,72	72	(%)

El análisis de resultados obtenidos tanto en la población de animales negativos así como en la población de animales positivos, mediante la prueba de ELISA indirecto, permitió determinar la especificidad diagnóstica y la sensibilidad diagnóstica de la prueba, alcanzando: una especificidad diagnóstica del 72%, siendo este porcentaje, la probabilidad de que el resultado negativo obtenido en esta prueba sea verdaderamente negativo cuando el animal está sano (Figura 16), y una sensibilidad diagnóstica del 100%, siendo este porcentaje, la probabilidad de que el resultado positivo obtenido en esta prueba sea verdaderamente positivo cuando el animal está enfermo (Figura 17).



Figura 16. Especificidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto



Figura 17. Sensibilidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto

4.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método de Fluorescencia Polarizada.

4.2.1. Especificidad Diagnóstica del método de Fluorescencia Polarizada.

La especificidad diagnóstica de la prueba de Fluorescencia Polarizada se estableció mediante el análisis de cincuenta y cuatro muestras de leche de animales seronegativos confirmados o también llamados verdaderos negativos, de las haciendas “San Jorge” y “Lucerito” (Tabla 11), evidenciando resultados negativos de las cincuenta y cuatro muestras analizadas, lo que corrobora la condición de animales sanos (Figura 18).

Tabla 11

*Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica FPA
ELLIE LLC*

FPA

N°	IDENTIFICACION	ΔmP	RESULTADO FPA
1	LG-1	-1,92	Negativo
2	LG-2	2,51	Negativo
3	LG-3	1,81	Negativo
4	LG-4	2,12	Negativo
5	LG-5	-0,86	Negativo
6	LG-6	-2,79	Negativo
7	LG-7	2,97	Negativo
8	LG-8	0,01	Negativo
9	LG-9	-3,89	Negativo
10	LG-10	-10,88	Negativo
11	LG-11	4,82	Negativo
12	LG-12	4,50	Negativo
13	LG-13	5,43	Negativo
14	LG-14	-2,99	Negativo
15	LG-15	8,79	Negativo
16	LG-16	-18,93	Negativo
17	LG-18	2,88	Negativo
18	LG-19	1,00	Negativo
19	LG-20	4,10	Negativo
20	LG-21	4,35	Negativo
21	LG-22	1,20	Negativo
22	LG-23	1,39	Negativo
23	LG-24	9,06	Negativo
24	LG-25	1,23	Negativo
25	RP-1	17,07	Negativo
26	RP-2	19,20	Negativo
27	RP-3	21,34	Negativo
28	RP-4	23,49	Negativo
29	RP-5	25,63	Negativo
30	RP-6	27,81	Negativo
31	RP-7	2,42	Negativo
32	RP-8	3,02	Negativo
33	RP-9	4,74	Negativo
34	RP-10	1,74	Negativo
35	RP-11	10,21	Negativo
36	RP-12	7,37	Negativo
37	RP-13	11,46	Negativo
38	RP-14	39,39	Negativo
39	RP-15	10,09	Negativo
40	RP-16	4,79	Negativo
41	RP-17	6,91	Negativo
42	RP-18	11,99	Negativo
43	RP-19	-0,18	Negativo
44	RP-20	13,45	Negativo
45	RP-21	4,49	Negativo
46	RP-22	9,15	Negativo
47	RP-23	9,43	Negativo
48	RP-24	13,63	Negativo
49	RP-25	37,78	Negativo
50	RP-26	27,93	Negativo
51	RP-27	30,19	Negativo
52	RP-28	25,54	Negativo
53	RP-29	30,88	Negativo
54	RP-30	32,13	Negativo

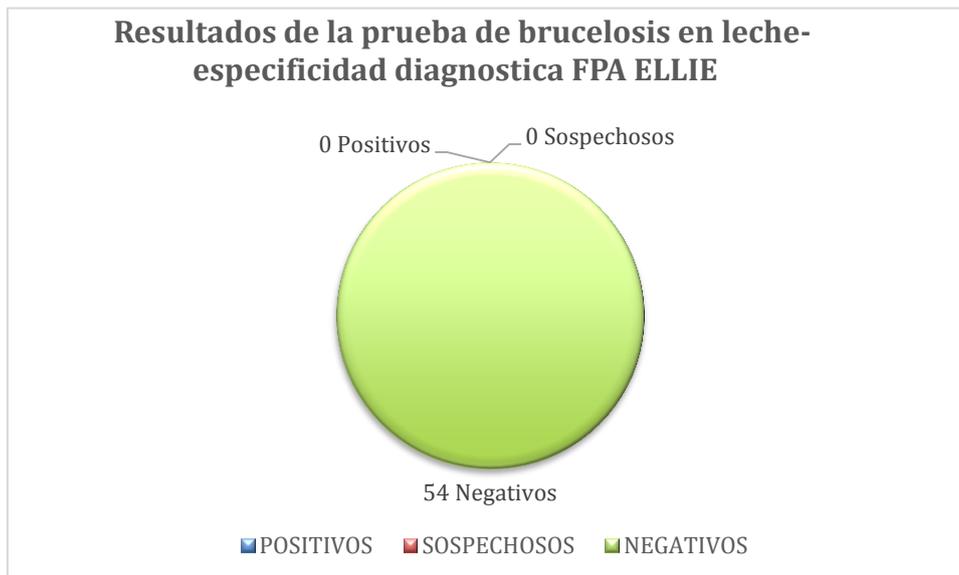


Figura 18. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- especificidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.

Se conoce mediante la prueba de ELISA competitivo para brucelosis que la población de este grupo de cincuenta y cuatro animales es 100% negativa, y esto se pudo evidenciar con los resultados obtenidos mediante la prueba de FPA, la misma que arrojó un 0% de animales positivos como se puede observar en la figura 19.



Figura 19. Porcentaje de animales diagnosticados como positivos en la prueba FPA.

La sensibilidad diagnóstica de la prueba de Fluorescencia polarizada se estableció mediante el análisis de once muestras de leche de animales

seropositivos confirmados o calificados como verdaderos positivos (Tabla 12). Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la prueba de FPA, corrobora los resultados de estas muestras analizadas, siendo positivos los once animales (Figura 20).

Tabla 12

Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.

FPA			
N°	IDENTIFICACION	ΔmP	RESULTADO FPA
1	LE-1705	86,01	POSITIVO
2	LE-173	88,17	POSITIVO
3	LE-176	87,83	POSITIVO
4	LP-LA HERRA	85,88	POSITIVO
5	LC-1	98,21	POSITIVO
6	LC-2	100,55	POSITIVO
7	LEC-170	87,09	POSITIVO
8	LEC-174	89,04	POSITIVO
9	LEC-177	86,85	POSITIVO
10	LEC-178	84,92	POSITIVO
11	LEC-180	97,15	POSITIVO



Figura 20. Resultados de la prueba de brucelosis en leche- sensibilidad diagnóstica FPA ELLIE LLC.

El 100% de los animales en estudio (once) son verdaderos positivos confirmados por la técnica de ELISA competitivo y cultivo bacteriológico, por lo

tanto el porcentaje de animales diagnosticados como negativos por la técnica de FPA debería ser del 0%, esto se pudo evidenciar en los resultados obtenidos tal como se muestra en la Figura 21.



Figura 21. Porcentaje de animales diagnosticados como negativos en la prueba FPA.

Los valores de la especificidad y la sensibilidad diagnóstica con respecto al punto de corte (ΔmP 10 para animales vacunados con Cepa19 y ΔmP 40 para animales vacunados con RB51) establecido por la casa comercial ELLIE LLC, fueron calculados con los resultados obtenidos de la población de animales negativos y de la población de animales positivos e ingresados en el cuadro de dos por dos, como se indica en la tabla 13. Obteniendo once verdaderos positivos, cero falsos positivos, cincuenta y cuatro verdaderos negativos y cero falsos negativos sumando un total de sesenta y cinco animales analizados para la prueba de FPA.

Tabla 13

Cálculos de sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba de FPA de ELLIE LLC.

	Cantidad de muestras de referencia necesarias			TOTAL	
	Que se sabe que son positivas (11)	Que se sabe que son negativas (54)			
Positivos	11	VP	FP	0	11
Negativos	0	FN	VN	54	54
TOTAL	11			54	65

PARÁMETRO	ECUACIONES	VALOR	RESULTADO	UNIDAD
Dse	$Dse = \frac{VP}{VP + FN}$ $Dse = \frac{11}{11 + 0}$	1,00	100	(%)
DSp	$DSp = \frac{VN}{VN + FP}$ $DSp = \frac{54}{54 + 0}$	1,00	100	(%)

El análisis de resultados obtenidos tanto en la población de animales negativos así como en la población de animales positivos, mediante la prueba de FPA, permitió determinar la especificidad diagnóstica y la sensibilidad diagnóstica de la prueba, alcanzando: una especificidad diagnóstica del 100%, siendo este porcentaje, la probabilidad de que el resultado negativo obtenido en esta prueba sea verdaderamente negativo cuando el animal está sano (Figura 22) y una sensibilidad diagnóstica del 100%, siendo este porcentaje, la probabilidad de que el resultado positivo obtenido en esta prueba sea verdaderamente positivo cuando el animal está enfermo (Figura 23).



Figura 22. Especificidad diagnóstica de la prueba de FPA



Figura 23. Sensibilidad diagnóstica de la prueba de FPA

4.3. Construcción de la curva ROC y cálculo del área bajo la curva de los ensayos de ELISA indirecto y Fluorescencia polariza

La estimación de la DSe y de la DSp se complementó con el análisis del área bajo (ABC) la curva de la Característica Operativa del Receptor (ROC), lo que permitió evaluar la exactitud de cada una de las pruebas, para lo cual fue necesario clasificar los diferentes resultados obtenidos en grupos de puntos de corte (Anexo 1 y 2), y en cada punto de corte se determinó los animales verdaderos negativos, verdaderos positivos, falsos negativos, falsos positivos y en base a estos resultados se estableció la sensibilidad y especificidad para poder graficar la curva ROC como se muestra en la tabla 14 y15.

Adicionalmente se calculó el índice de Youden para la prueba de ELISA indirecto, esperando obtener el valor más alto del mismo en el punto de corte (S/P 45) establecido por la casa comercial, pero según los resultados obtenidos de los cálculos se obtuvo el valor más alto (0.80) en el punto de corte de S/P de 75 y 80, donde se registro la más alta DSe (100%) y DSp (80%) como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14

Indicadores (VP, FP, VN, FN, DSe, DSp) para la construcción de la curva ROC-técnica de ELISA indirecto de IDVET

NUMERO	PUNTO CORTE	VP	FP	VN	FN	TOTAL	DSe	DSp	1-DSp	INDICE DE YODEN
1	5	11	50	4	0	65	1,00	0,07	0,93	0,07
2	10	11	43	11	0	65	1,00	0,20	0,80	0,20
3	20	11	30	24	0	65	1,00	0,44	0,56	0,44
4	30	11	24	30	0	65	1,00	0,56	0,44	0,56
5	35	11	21	33	0	65	1,00	0,61	0,39	0,61
6	40	11	17	37	0	65	1,00	0,69	0,31	0,69
7	45	11	15	39	0	65	1,00	0,72	0,28	0,72
8	50	11	14	40	0	65	1,00	0,74	0,26	0,74
9	55	11	13	41	0	65	1,00	0,76	0,24	0,76
10	60	11	13	41	0	65	1,00	0,76	0,24	0,76
11	65	11	12	42	0	65	1,00	0,78	0,22	0,78
12	70	11	12	42	0	65	1,00	0,78	0,22	0,78
13	75	11	11	43	0	65	1,00	0,80	0,20	0,80
14	80	11	11	43	0	65	1,00	0,80	0,20	0,80
15	100	8	9	45	3	65	0,73	0,83	0,17	0,56
16	150	4	5	49	7	65	0,36	0,91	0,09	0,27
17	200	4	2	52	7	65	0,36	0,96	0,04	0,33
18	250	3	0	54	8	65	0,27	1,00	0,00	0,27
19	300	1	0	54	10	65	0,09	1,00	0,00	0,09
20	350	0	0	54	11	65	0,00	1,00	0,00	0,00

La curva ROC permitió graficar la DSe y DSp de cada uno de los posibles puntos de corte de las pruebas diagnósticas. En el eje Y se representó la sensibilidad y en el eje X se representó a 1-Especificidad de cada uno de los puntos de corte como se observa en la Figura 24.

En el gráfico de la curva ROC para la prueba de ELISA indirecto podemos observar graficada la línea diagonal de referencia o de no discriminación la cual va del punto 0.0 al punto 1.1, la misma que equivale a un valor del área bajo la curva de 0.5. Al graficar la curva ROC de la prueba, se pudo evidenciar que el ELISA indirecto es una prueba diagnóstica regularmente discriminativa porque el área bajo la curva ROC de este ensayo fue de 0.83 y no de 1 que sería el valor ideal para una prueba altamente discriminativa (Figura 24).

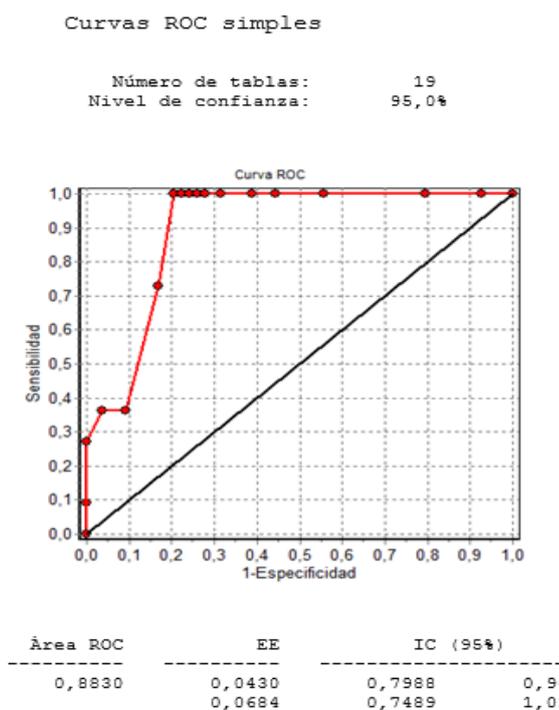


Figura 24. Curva ROC para la técnica de ELISA indirecto de IDVET

De igual manera para la prueba de FPA, se calculó el índice de Youden, esperando obtener el valor más alto del mismo en el punto de corte (ΔmP 20 a 40) establecido por la casa comercial, pero según los resultados obtenidos de los cálculos se obtuvo el valor más alto (1.0) en los puntos de corte de ΔmP entre 40 y 80, donde se registro la más alta DSe (100%) y DSp (100%) como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15

Indicadores (VP, FP, VN, FN, DSe, DSp) para construcción de la curva ROC-técnica de FPA de ELLIE LLC.

NUMERO	PUNTO CORTE	VP	FP	VN	FN	TOTAL	DSe	DSp	1-DSp	INDICE DE YODEN
1	5	11	26	28	0	65	1,00	0,52	0,48	0,52
2	10	11	19	35	0	65	1,00	0,65	0,35	0,65
3	15	11	13	41	0	65	1,00	0,76	0,24	0,76
4	20	11	11	43	0	65	1,00	0,80	0,20	0,80
5	25	11	9	45	0	65	1,00	0,83	0,17	0,83
6	30	11	5	49	0	65	1,00	0,91	0,09	0,91
7	35	11	2	52	0	65	1,00	0,96	0,04	0,96
8	40	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
9	45	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
10	50	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
11	55	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
12	60	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
13	65	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
14	70	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
15	75	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
16	80	11	0	54	0	65	1,00	1,00	0,00	1,00
17	85	10	0	54	1	65	0,91	1,00	0,00	0,91
18	90	3	0	54	8	65	0,27	1,00	0,00	0,27
19	95	3	0	54	8	65	0,27	1,00	0,00	0,27
20	100	1	0	54	10	65	0,09	1,00	0,00	0,09

En el gráfico de la curva ROC para la prueba de FPA se observa graficada la línea diagonal de referencia o de no discriminación la cual va del punto 0.0 al punto 1.1, la misma que equivale a un valor del área bajo la curva de 0.5. Al graficar la curva ROC de la prueba, se pudo evidenciar que el FPA es una prueba diagnóstica altamente discriminativa porque el área bajo la curva ROC de este ensayo fue de 0.99, lo que significa que es un valor muy cercano a 1 que sería el valor ideal para una prueba altamente discriminativa (Figura 25).

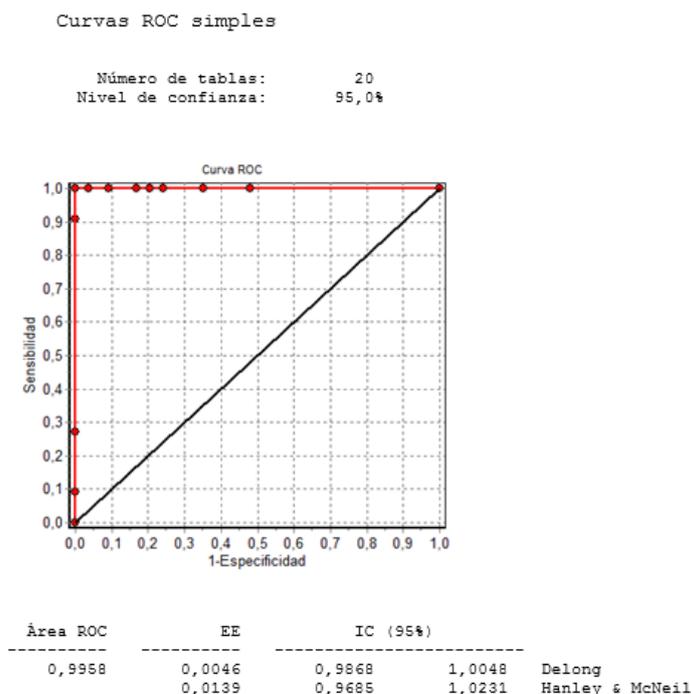


Figura 25. Curva ROC para la técnica de FPA de ELLIE LLC.

4.4. Comparación de las técnicas de ELISA indirecto y fluorescencia Polarizada

En la tabla 16 se observa la población de animales negativos ubicados en la hacienda San Jorge, los mismos que fueron previamente analizados serológicamente con la prueba de Rosa de bengala y la prueba de ELISA competitivo para *Brucella abortus.*, observando que todos estos animales en estudio son animales sanos y obteniendo resultados negativos a la prueba confirmatoria ELISA competitivo. Además se pudo evidenciar que la prueba de ELISA indirecto en leche detectó un animal positivo dentro de esta población de animales negativos, mientras que la prueba de FPA en leche identificó a todos los animales como negativos.

Tabla 16

Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestras de leche de la hacienda San Jorge y de las pruebas serológicas Rosa de Bengala y ELISA competitivo.

1.1.1	ID	EDAD	VACUNA	ELISA INDIRECTO (IDVET) LECHE		FPA (ELLIE) LECHE		ROSA DE BENGALA SUERO (ELLIE)	ELISA COMPETITIVO SUERO (SVANOVA)	
				SP	RESULTADO	ΔmP	RESULTADO CON RB51		PI	RESULTADO
1	LG-1	5 años	RB51	10,23	Negativo	-1,92	Negativo	Negativo		
2	LG-2	5 años	RB51	4,16	Negativo	2,51	Negativo	Negativo		
3	LG-3	3 años	RB51	8,87	Negativo	1,81	Negativo	Negativo		
4	LG-4	6 años	RB51	10,05	Negativo	2,12	Negativo	POSITIVO	21,68	Negativo
5	LG-5	3 años	RB51	15,03	Negativo	-0,86	Negativo	Negativo		
6	LG-6	3 años	RB51	4,89	Negativo	-2,79	Negativo	Negativo		
7	LG-7	2 años	RB51	2,99	Negativo	2,97	Negativo	Negativo		
8	LG-8	4 años	RB51	13,40	Negativo	0,01	Negativo	Negativo		
9	LG-9	4 años	RB51	17,29	Negativo	-3,89	Negativo	Negativo		
10	LG-10	4 años	RB51	19,74	Negativo	-10,88	Negativo	Negativo		
11	LG-11	4 años	RB51	37,57	Negativo	4,82	Negativo	Negativo		
12	LG-12	4 años	RB51	73,65	POSITIVO	4,50	Negativo	Negativo		
13	LG-13	2 años	RB51	6,13	Negativo	5,43	Negativo	Negativo		
14	LG-14	2 años	RB51	29,70	Negativo	-2,99	Negativo	Negativo		
15	LG-15	5 años	RB51	3,98	Negativo	8,79	Negativo	Negativo		
16	LG-16	3 años	RB51	10,68	Negativo	-18,93	Negativo	Negativo		
17	LG-18	5 años	RB51	11,05	Negativo	2,88	Negativo	Negativo		
18	LG-19	4 años	RB51	11,32	Negativo	1,00	Negativo	Negativo		
19	LG-20	5 años	RB51	7,88	Negativo	4,10	Negativo	Negativo		
20	LG-21	4 años	RB51	16,57	Negativo	4,35	Negativo	Negativo		
21	LG-22	3 años	RB51	8,78	Negativo	1,20	Negativo	Negativo		
22	LG-23	2 años	RB51	6,16	Negativo	1,39	Negativo	Negativo		
23	LG-24	2 años	RB51	13,13	Negativo	9,06	Negativo	POSITIVO	3,48	Negativo
24	LG-25	3 años	RB51	21,82	Negativo	1,23	Negativo	Negativo		

La prueba de ELISA indirecto identificó a un 4.17% de los animales de la población de negativa de la hacienda San Jorge, como positivos al contrario de la prueba de FPA, la cual identificó al 100% de animales como negativos (Figura 26).

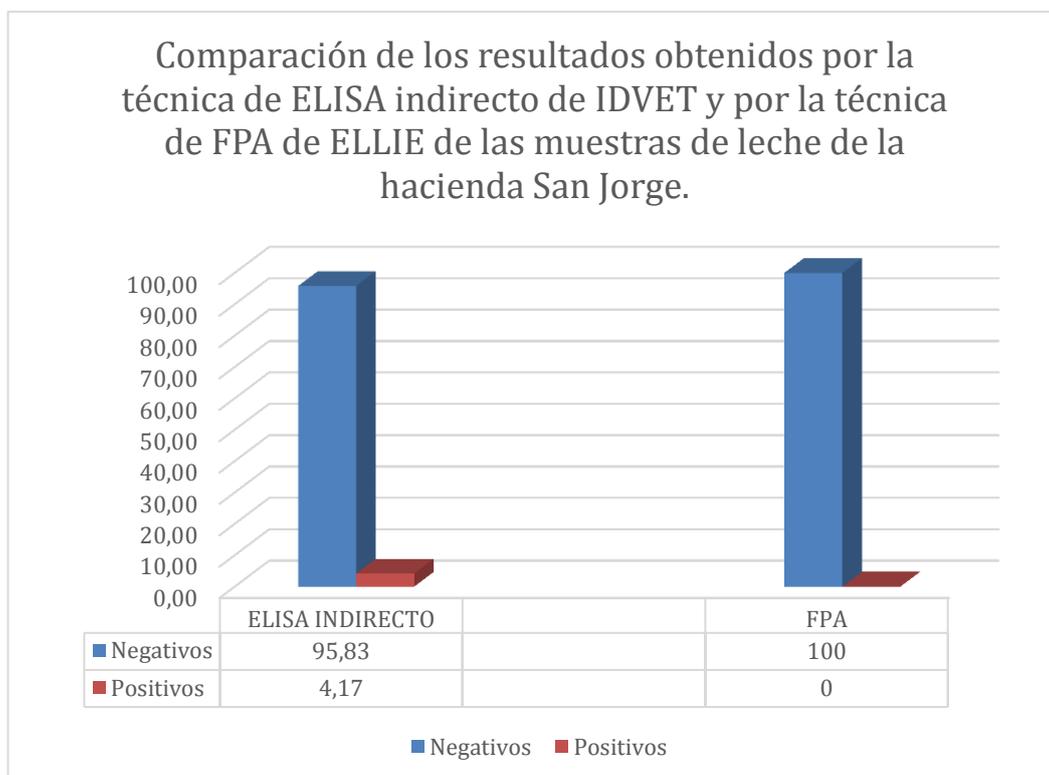


Figura 26. Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestras de leche de la hacienda San Jorge.

En la tabla 17 se observa la población de animales negativos ubicados en la hacienda Lucerito, los mismos que fueron previamente analizados serológicamente con la prueba de Rosa de bengala y que al obtener resultados negativos no fue necesario realizar la prueba de ELISA competitivo para *Brucella abortus.*, observando que todos estos animales en estudio son animales sanos.

Adicionalmente se pudo evidenciar que la prueba de ELISA indirecto detectó catorce animales positivos dentro de esta población de animales negativos, mientras que la prueba de FPA en leche identificó a todos los animales como negativos, siendo esta 100% comparable con los resultados de la prueba de Rosa de Bengala en suero.

Tabla 17

Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestra de leche de la hacienda Lucerito y de las pruebas serológicas Rosa de Bengala y ELISA competitivo.

N°	ID	EDAD	VACUNA	ELISA INDIRECTO (IDVET)		FPA (ELLIE)		ROSA DE BENGALA SUERO (ELLIE)	ELISA COMPETITIVO SUERO (SVANOVA)	
				SP	RESULTADO	Δ mP	RESULTADO CON RB51		PI	RESULTADO
1	RP-1	5 años	RB51 / CEPA19	18,19	Negativo	17,07	Negativo	Negativo		
2	RP-2	6 años	RB51 / CEPA19	31,30	Negativo	19,20	Negativo	Negativo		
3	RP-3	3 años	RB51 / CEPA19	20,15	Negativo	21,34	Negativo	Negativo		
4	RP-4	6 años	RB51 / CEPA19	40,21	Negativo	23,49	Negativo	Negativo		
5	RP-5	3 años	RB51 / CEPA19	140,08	POSITIVO	25,63	Negativo	Negativo		
6	RP-6	7 años	RB51 / CEPA19	83,55	POSITIVO	27,81	Negativo	Negativo		
7	RP-7	5 años	RB51 / CEPA19	189,48	POSITIVO	2,42	Negativo	Negativo		
8	RP-8	5 años	RB51 / CEPA19	36,29	Negativo	3,02	Negativo	Negativo		
9	RP-9	6 años	RB51 / CEPA19	9,27	Negativo	4,74	Negativo	Negativo		
10	RP-10	3 años	RB51 / CEPA19	9,01	Negativo	1,74	Negativo	Negativo		
11	RP-11	3 años	RB51 / CEPA19	173,79	POSITIVO	10,21	Negativo	Negativo		
12	RP-12	3 años	RB51 / CEPA19	150,16	POSITIVO	7,37	Negativo	Negativo		
13	RP-13	3 años	RB51 / CEPA19	50,82	POSITIVO	11,46	Negativo	Negativo		
14	RP-14	3 años	RB51 / CEPA19	47,35	SOSPECHOSO	39,39	Negativo	Negativo		
15	RP-15	3 años	RB51 / CEPA19	200,45	POSITIVO	10,09	Negativo	Negativo		
16	RP-16	3 años	RB51 / CEPA19	37,98	Negativo	4,79	Negativo	Negativo		
17	RP-17	6 años	RB51 / CEPA19	111,37	POSITIVO	6,91	Negativo	Negativo		
18	RP-18	7 años	RB51 / CEPA19	25,95	Negativo	11,99	Negativo	Negativo		
19	RP-19	6 años	RB51 / CEPA19	31,12	Negativo	-0,18	Negativo	Negativo		
20	RP-20	3 años	RB51 / CEPA19	217,83	POSITIVO	13,45	Negativo	Negativo		
21	RP-21	3 años	RB51 / CEPA19	39,95	Negativo	4,49	Negativo	Negativo		
22	RP-22	3 años	RB51 / CEPA19	81,59	POSITIVO	9,15	Negativo	Negativo		
23	RP-23	6 años	RB51 / CEPA19	40,12	Negativo	9,43	Negativo	Negativo		
24	RP-24	3 años	RB51 / CEPA19	125,19	POSITIVO	13,63	Negativo	Negativo		
25	RP-25	3 años	RB51 / CEPA19	60,19	POSITIVO	37,78	Negativo	Negativo		
26	RP-26	3 años	RB51 / CEPA19	18,19	Negativo	27,93	Negativo	Negativo		
27	RP-27	3 años	RB51 / CEPA19	27,02	Negativo	30,19	Negativo	Negativo		
28	RP-28	3 años	RB51 / CEPA19	31,30	Negativo	25,54	Negativo	Negativo		
29	RP-29	5 años	RB51 / CEPA19	21,40	Negativo	30,88	Negativo	Negativo		
30	RP-30	7 años	RB51 / CEPA19	101,56	POSITIVO	32,13	Negativo	Negativo		

La prueba de ELISA indirecto en leche identificó a un 46.67% de los animales de la población de negativa de la hacienda Lucerito, como positivos al contrario de la prueba de FPA en leche, la cual identificó a este grupo de animales como negativos. (Figura 27).

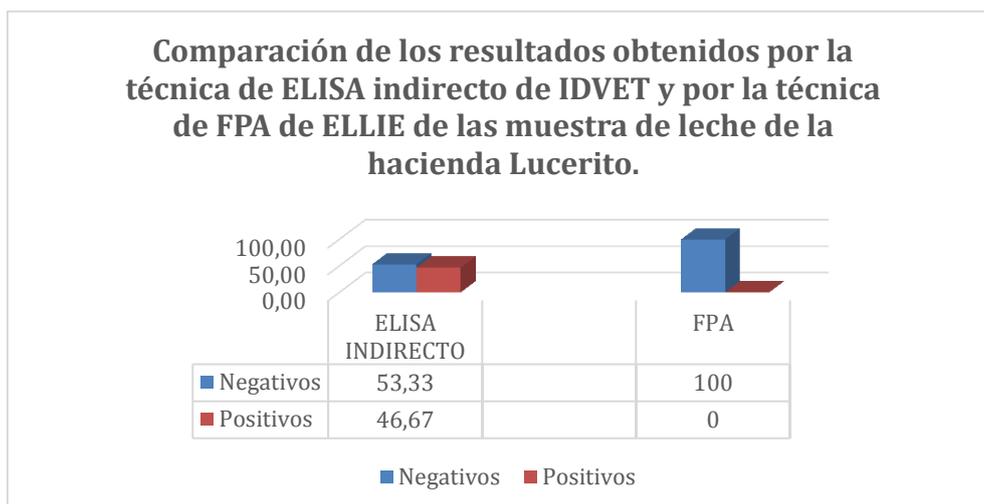


Figura 27. Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las muestra de leche de la hacienda Lucerito

En la figura 28, se muestra la comparación de los resultados del total de los animales muestreados de las hacienda San Jorge y Lucerito, donde se pudo apreciar que la técnica de ELISA indirecto, identificó a un 27.78% de los animales de la población negativa de las dos haciendas, como positivos (Falsos positivos) y solo un 72.22 % de animales negativos (Verdaderos negativos); al contrario de la prueba de FPA, la cual identificó al 100% de este grupo de animales como negativos (Verdaderos negativos), por lo tanto 0% de animales positivos (Falsos positivos).

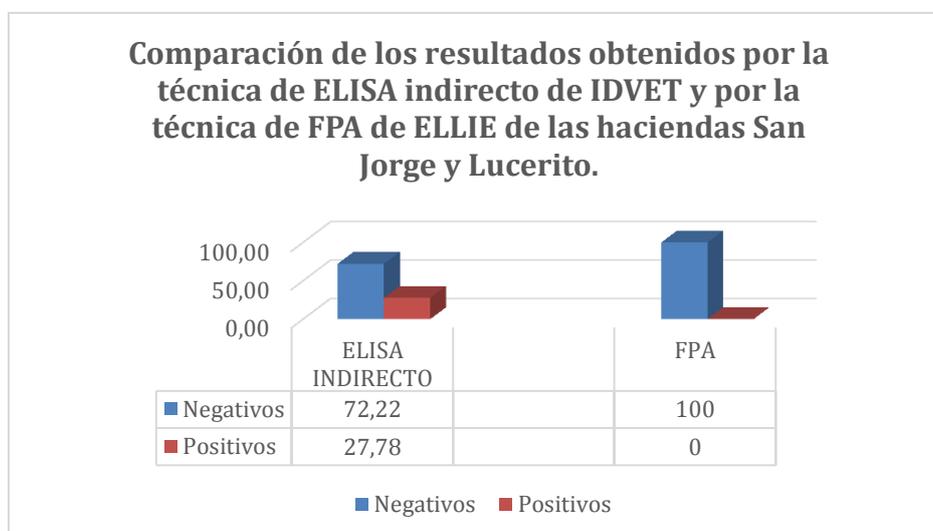


Figura 28. Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC de las haciendas San Jorge y Lucerito.

Tabla 18.

Comparación de los resultados obtenidos por la técnica de ELISA indirecto de IDVET y por la técnica de FPA de ELLIE LLC, de las muestras de leche positivas tomadas para la determinación de sensibilidad diagnóstica y de las pruebas serológicas Rosa de Bengala y Elisa competitivo

N°	ID	VACUNA	ELISA INDIRECTO LECHE (IDVET)		FPA LECHE (ELLIE)		ROSA DE BENGALA SUERO (ELLIE)	ELISA COMPETITIVO SUERO (SVANOVA)	
			SP	RESULTADO	ΔmP	RESULTADO CON RB51		PI	RESULTADO
1	LE-1705	Cepa 19	102,58	POSITIVO	86,01	POSITIVO	POSITIVO	81.78	POSITIVO
2	LE-173	Cepa 19	113,72	POSITIVO	88,17	POSITIVO	POSITIVO	90.25	POSITIVO
3	LE-176	Cepa 19	204,26	POSITIVO	87,83	POSITIVO	POSITIVO	93.87	POSITIVO
4	LP-LA HERRA	Cepa 19	258,76	POSITIVO	85,88	POSITIVO	POSITIVO	90.50	POSITIVO
5	LC-1	Cepa 19	325,12	POSITIVO	98,21	POSITIVO	POSITIVO	92.3	POSITIVO
6	LC-2	Cepa 19	97,60	POSITIVO	100,55	POSITIVO	POSITIVO	90.0	POSITIVO
7	LEC-170	Cepa 19	100,14	POSITIVO	87,09	POSITIVO	POSITIVO	82.36	POSITIVO
8	LEC-174	Cepa 19	86,56	POSITIVO	89,04	POSITIVO	POSITIVO	90.24	POSITIVO
9	LEC-177	Cepa 19	84,74	POSITIVO	86,85	POSITIVO	POSITIVO	93.56	POSITIVO
10	LEC-178	Cepa 19	104,66	POSITIVO	84,92	POSITIVO	POSITIVO	82.47	POSITIVO
11	LEC-180	Cepa 19	278,50	POSITIVO	97,15	POSITIVO	POSITIVO	91.02	POSITIVO

En la tabla 18 se observa la población de animales positivos, los mismos que fueron previamente analizados serológicamente con la prueba de rosa de bengala y la prueba de ELISA competitivo para *Brucella* sp., observando que todos estos animales en estudio son animales enfermos y donde los resultados para la prueba de ELISA competitivo fueron positivos. Adicionalmente se pudo evidenciar que tanto la prueba de ELISA indirecto como la de FPA en leche detectaron a todos los animales como positivos dentro de esta población de animales positivos, siendo las dos pruebas 100% comparables con los resultados de la prueba confirmatoria ELISA competitivo.

Al analizar la población de animales positivos por las dos pruebas diagnósticas, se pudo determinar que tanto la prueba de ELISA indirecto así como la prueba de FPA no arrojan resultados negativos identificando al 100% de la población como positiva (Figura 29).

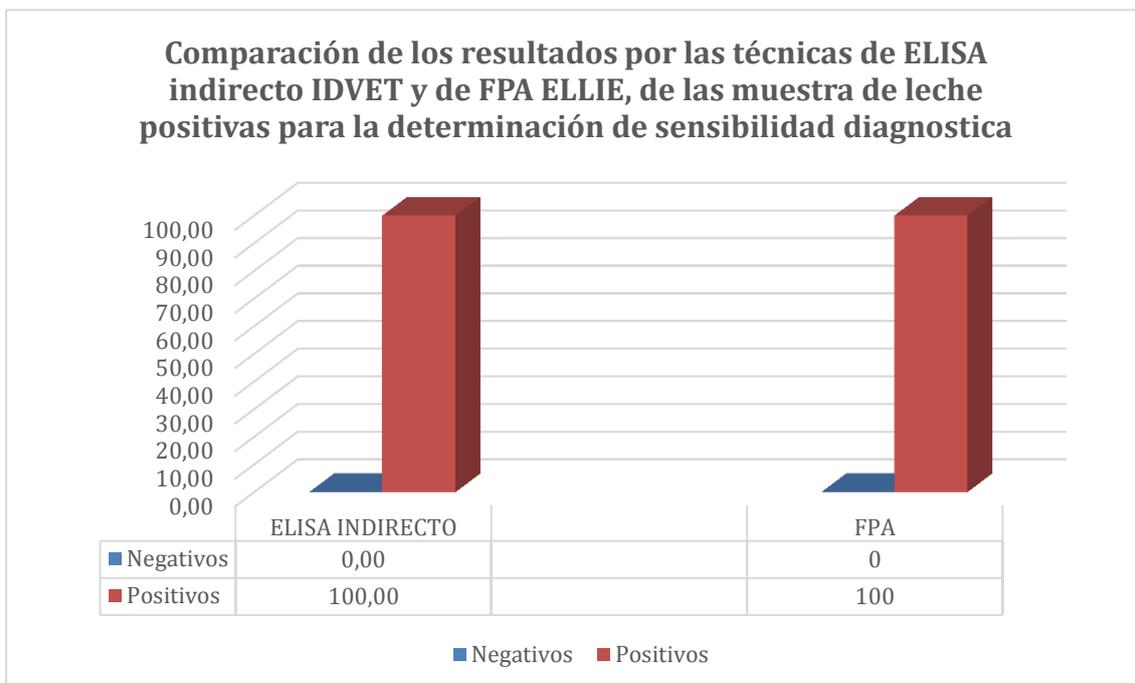


Figura 29. Comparación de los resultados por las técnicas de ELISA indirecto IDVET y de FPA ELLIE LLC, de las muestra de leche positivas para la determinación de sensibilidad diagnóstica

La prueba de FPA permitió identificar adecuadamente a los animales como verdaderos positivos (100%, lo que equivale a la sensibilidad diagnóstica) y verdaderos negativos (100%, lo que equivale a la especificidad diagnóstica) sin resultados falsos positivos (0%) y falsos negativos (0%), como se muestra en la figura 30.

La prueba de ELISA indirecto, clasificó erróneamente a un grupo de animales negativos como positivos o en este caso conocidos como falsos positivos (27.78%), por lo tanto el porcentaje de animales verdaderos negativos fue de 72.22% lo que equivale a la especificidad diagnóstica, verdaderos positivos del 100% lo que equivale a la sensibilidad diagnóstica y falsos negativos del 0% (Figura 30).

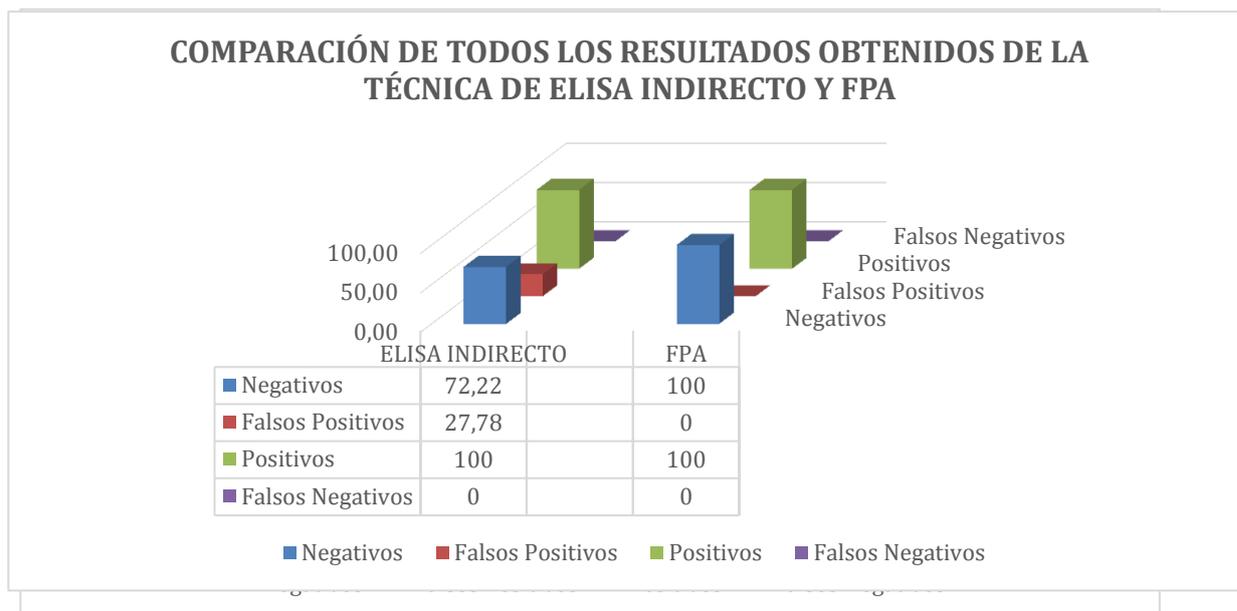


Figura 30. Comparación de todos los resultados obtenidos de la técnica de ELISA indirecto y FPA

5. DISCUSIÓN

5.1. Sensibilidad y especificidad ELISA Indirecto

Los resultados positivos (falsos positivos) obtenidos por la prueba de ELISA indirecto en el grupo de animales sanos, pudo deberse a reacciones cruzadas por la presencia de Anticuerpos vacunales independientemente de la cepa que se utilice RB51 o cepa19, por vacunaciones y revacunaciones fuera de edad reglamentaria, revacunaciones en animales adultos con cepa 19, genética del animal, por “otras bacterias Gram negativas como: *Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Haemophilus*, *Francisella spp.*, *Salmonella spp.* *Campylobacter* “ (Diaz , Soto, & Estein, 2012) o por el uso de vacunas tipo bacterina que usan esos microorganismos.

Las reacciones cruzadas se deben a la semejanza del lipo-polisacarido O (OPS) de algunas bacterias Gram negativas con el de *Brucella sp.* (Diaz , Soto, & Estein, 2012).

La prueba de ELISA indirecto tuvo la capacidad de detectar el 100% de animales positivos, ya que en sus placas se encuentra impregnado el lipo-polisacarido sLPS u OPS como antígeno, convirtiéndole en una prueba altamente sensible para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* sp., en ganado bovino pero no permite la diferenciación entre anticuerpos originados por vacunación con cepa 19, RB51, o anticuerpos de otras bacterias que dan reacciones cruzadas, lo que permite identificar tanto animales verdaderamente positivos así como animales falsos positivos (OIE, 2016).

5.2. Sensibilidad y especificidad FPA

Los resultados negativos (verdaderos negativos) obtenidos por la prueba de FPA en el grupo de animales sanos se debió a que esta prueba utiliza como antígeno un fragmento de bajo peso del OPS del lipo-polisacarido mas no todo el LPS como en la prueba de ELISA indirecto lo cual le permitió a la prueba no detectar anticuerpos de reacción cruzada o heteroespecíficos por vacuna u otro tipo de bacterias Gram negativas y de igual manera esta característica de la estructura de la prueba fue lo que le permitió detectar el 100% de animales verdaderos positivos (OIE, 2016).

En la prueba de ELISA indirecto la probabilidad de que la muestra resulte positiva cuando el animal está realmente enfermo es del 100%, por lo tanto podemos decir que esta prueba es muy sensible al igual que la prueba de FPA.

La probabilidad de que la muestra resulte negativa cuando el animal está realmente sano es del 72.22 % para la prueba de ELISA indirecto, por lo tanto menos especifica que el FPA, el mismo que tiene una especificidad diagnóstica del 100%.

5.3. Curva ROC

El área bajo la curva para la prueba de ELISA indirecto de 0.8830 indicó que la prueba no es tan discriminativa comparada con la prueba de FPA con un área bajo la curva de 0.9958, dándole así la característica de prueba altamente

discriminatoria o perfecta lo que permite distinguir de mejor manera animales sanos y enfermos a lo largo de los posibles puntos de corte establecidos en el rango. (Cerde, J., Cifuentes, L. 2012) (Ivasnovska, y otros, 2010). El área bajo la curva provee estimaciones numéricas que van de cero punto cinco (0.5) a uno (1), clasificando a la prueba como inútil a perfecta respectivamente (OIE, 2014).

Los animales verdaderos positivos, verdaderos negativo, falsos positivos y falsos negativos fueron clasificados en base a una condición conocida de enfermos y sanos, a partir de una prueba diagnóstica confirmatoria como es el ELISA competitivo. De acuerdo a estos resultados se estableció la DSe y la DSp para cada posible punto de corte del ELISA indirecto, siendo el punto de corte ideal un valor S/P de 75 ya que presenta el mayor índice de Youden (0.80) donde la DSe (100%) y DSp (80 %) son las mas altas conjuntamente (Cerde, Cifuentes, 2012), por lo que se debería tomar en cuenta el nuevo punto de corte según nuestro estudio.

En el caso de la prueba de FPA, se obtuvieron varios puntos de corte con un índice de Youden alto el cual indicaba una alta sensibilidad y una alta especificidad para todos estos, al ser el FPA un test diagnostico confirmatorio se requirió de mayor especificidad que de sensibilidad, por lo tanto no se utilizó el índice de Youden para determinar el punto de corte ideal, para este caso se seguirán utilizando los puntos de corte sugeridos por la casa comercial.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La comparación de resultados obtenidos de las pruebas de ELISA indirecto y FPA permitió determinar que la técnica más sensible y específica para el diagnóstico de anticuerpos contra brucelosis en leche de bovinos, es la prueba de fluorescencia polarizada FPA, la cual presenta una especificidad diagnóstica del 100 %, sensibilidad diagnóstica del 100 % y una capacidad de discriminación del 99.58% (área bajo la curva ROC de 0.9958), indicando que dicha prueba es altamente discriminatoria o que permite distinguir claramente entre animales enfermos y no enfermos.

La prueba de ELISA indirecto y FPA presentan la misma sensibilidad (100%) pero diferente especificidad (72,22 % en ELISA indirecto y 100 % en FPA), siendo más específica la prueba de FPA.

Los ensayos realizados por la técnica de Fluorescencia Polarizada para la detección de anticuerpos contra brucelosis bovina son mucho más sencillos y el tiempo de procesamiento de muestras es más rápido que la prueba de Elisa indirecto.

La sensibilidad diagnóstica de la prueba de ELISA indirecto fue del 100% y la especificidad diagnóstica fue del 72.22%. La sensibilidad diagnóstica de la prueba de FPA fue del 100% y la especificidad diagnóstica fue del 100%.

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA indirecto tanto de la hacienda San Jorge como de la hacienda Lucerito, evidenció que dicha técnica tiene reacciones cruzadas con anticuerpos vacunales Cepa 19 y RB51 o anticuerpos de otras bacterias presentes en las muestras. Mientras que la prueba de FPA no presenta reacciones cruzadas con anticuerpos vacunales u otro tipo de anticuerpos.

6.2. Recomendaciones

Antes de realizar un estudio de SeD y SpD es recomendable conocer el estado de vacunación y la historia clínica de los animales a estudiarse.

Para poder establecer el status sanitario de un animal es recomendable evaluar las muestras con una prueba altamente sensible y una o dos pruebas altamente específicas.

Es recomendable hacer un PCR para correlacionar los resultados tanto positivos como negativos a brucelosis.

Se recomienda que la industria láctea implemente pruebas más específicas para el diagnóstico de animales positivos, debido a la interferencia vacunal y de otro tipo de bacterias.

Se recomienda realizar un estudio en una población más grande en una matriz de sueros y leche por la técnica de FPA.

Se recomienda tomar como punto de corte de 75 S/P del ELISA indirecto, identificado por el índice de Youden

REFERENCIAS

- AGROCALIDAD. (2016). *Resolución 0131*. Quito: Registro Oficial del Ecuador.
- Castro, H. G. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 203-216.
- Cerda, J., & Cifuentes, L. (01 de 04 de 2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teóricos - prácticos. *Revista Chilena de infectología*, 29(2), 138 - 141.
- Díaz , A. G., Soto, P., & Estein, S. M. (2012). Estudio de la interferencia serológica en el diagnóstico de la brucelosis bovina en el modelo murino. *INVET*, 14(1), 69-77. Recuperado el 25 de 08 de 2018, de <http://www.scielo.org.ar/pdf/invet/v14n1/v14n1a08.pdf>
- ELLIE LLC. (2016). Brucella S antibody test kit, Product COd B100 Package Insert 031. WI, USA.
- Hernández, D., & Cabiedes, J. (2009). *Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes*. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F, México, Departamento de Inmunología y Reumatología, México. Recuperado el 06 de 06 de 2018, de <http://www.reumatologiaclinica.org/en/tecnicas-inmunologicas-que-apoyan-el/articulo/S1699258X09002411/>
- IDVET. (2015). Inserto del Kit ELISA indirecto para detección de anticuerpos contra Brucelosis bovina en leche. Francia.
- INEN. (2012). Leche Cruda. Requisitos. En INEN, *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 9:2012*. Quito: INEN.
- Ivasnovska, T., Schenk, A., Homeyer, A., Meihong, D., Uta, D., Olaf, D., . . . Lars, L. (2010). A fast and robust hepatocyte quantification algorithm including vein processing. *BMC BIO INFORMATICS*, 11-124, 1-18. doi:10.1186/1471-2105-11-124
- Junco, R., & Rodríguez, C. (2001). Capítulo 7 Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En *Microbiología y Parasitología Médica* (págs. 45 - 54).

- Nicola, A. M., & Elena, S. (2009). *Manual de Diagnostico serologico de brucelosis bovina*. Argentina.
- Nielsen, D. G. (05 de 2004). Serological diagnosis of bovine brucellosis. *Rev Sci Tech*, 989 - 1002.
- OMS, FAO. (2011). Leche y Productos Lácteos. En F. OMS, *Codex Alimentarius* (págs. 191 - 246). Roma.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. Suiza: WHO Press. Recuperado el 12 de 05 de 2018, de <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>
- Organizacion Mundial de la Salud OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura (FAO). (2011). Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos (CAC/RCP 57-2004). En C. ALIMENTARUS, *LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS* (pág. 191). Roma.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2014). *Capítulo 1.1.6 Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*. Recuperado el 14 de 05 de 2018, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06_Validaci%C3%B3n_Spanish%202013.pdf
- Organizacion Mundial de Sanidad Animal. (2014). Capitulo 3.6.1 Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de anticuerpos. En O. M. Animal, *Manual Terrestre*. Recuperado el 12 de 05 de 2018, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.6.1_ANTIBODY_DETECT.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2014). Capitulo 3.6.5 Enfoques estadísticos de la validación. En O. M. Animal, *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (pág. 7). Paris. Recuperado el 15 de 05 de 2018, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.6.5_STATISTICAL_VALIDATION.pdf

- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2016). *Cap. 2.1.4 Brucelosis (Infección por B.abortus, B. melitensis y B. suis)*. Recuperado el 12 de 05 de 2018, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.04_BOVINE_BRUCELL.pdf
- Ron, J. R. (2014). Human Brucellosis in Northwest Ecuador: Typifying *Brucella* spp., Seroprevalence, and Associated Risk Factors. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES*, 1-10.
- Svanova Veterinary Diagnostics. (s.f.). www.svanova.com. Obtenido de http://www.svanova.com/content/dam/internet/ah/svanova/dk_EN/documents/Test%20technology.pdf
- WHO, FAO. (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. Suiza.
- Zambrano, M. P. (2016). Brucelosis Bovina en la Provincia Manabí, Ecuador. Estudio de los Factores de Riesgo. *Revista de Investigación UNMSM*, 607-617.

ANEXOS

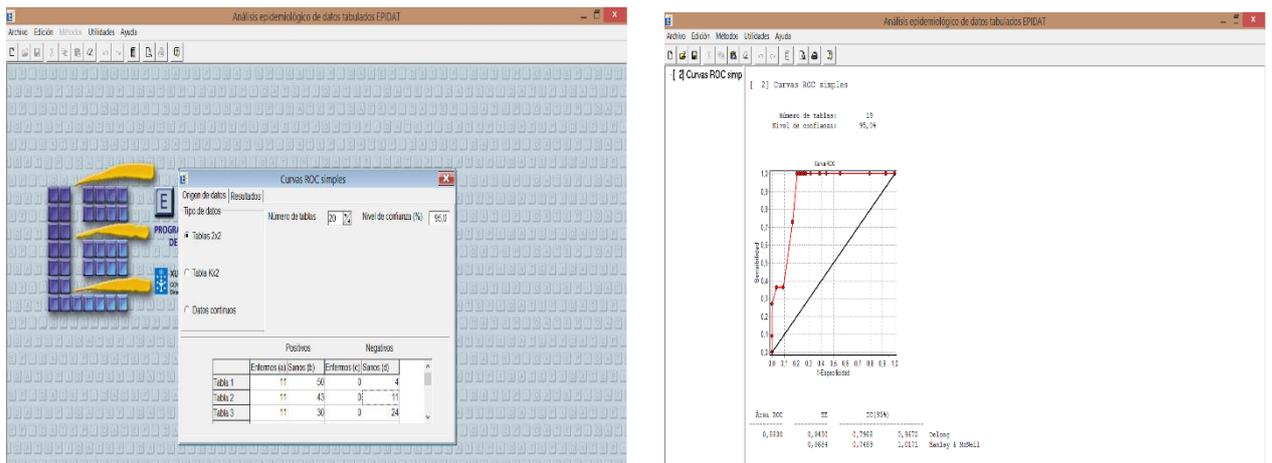
Anexo 1. Organización de datos de acuerdo a diferentes puntos de corte para los ensayos realizados en las muestras de leche por la técnica de ELISA indirecto de IDVET

	PUNTOS DE CORTE										
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100	>100
	4,16	10,23	29,70	37,57	40,21	50,82	60,19	73,65	83,55	97,60	140,08
	4,89	10,05	21,82	31,30	47,35				81,59		189,48
	2,99	15,03	20,15	36,29	40,12				86,56		173,79
	3,98	13,40	25,95	37,98					84,74		150,16
	8,87	17,29	27,02	31,12							200,45
	6,13	19,74	21,40	39,95							111,37
	7,88	10,68		31,30							217,83
	8,78	11,05									125,19
	6,16	11,32									101,56
	9,27	16,57									102,58
	9,01	13,13									113,72
		18,19									204,26
		18,19									258,76
											325,12
											100,14
											104,66
											278,50
TOTAL	11	13	6	7	3	1	1	1	4	1	17
TOTAL ANIMALES											65

Anexo 2. Organización de datos de acuerdo a diferentes puntos de corte para los ensayos realizados en las muestras de leche por la técnica FPA de ELLIE LLC.

PUNTOS DE CORTE												
0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	80-85	85-90	90-100	100 a mas	
-1,92	5,43	10,21	17,07	21,34	25,63	30,19	39,39	84,92	86,01	98,21	100,55	
2,51	8,79	11,46	19,20	23,49	27,81	30,88	37,78		88,17	97,15		
1,81	9,06	10,09			27,93	32,13			87,83			
2,12	7,37	11,99			25,54				85,88			
-0,86	6,91	13,45							87,09			
-2,79	9,15	13,63							89,04			
2,97	9,43								86,85			
0,01												
-3,89												
-10,88												
4,82												
-2,99												
-18,93												
2,88												
1,00												
4,10												
4,35												
1,20												
1,39												
1,23												
4,50												
2,42												
3,02												
4,74												
1,74												
4,79												
4,49												
-0,18												
TOTAL	28	7	6	2	2	4	3	2	1	7	2	1
TOTAL ANIMALES	65											

Anexo 3. Software EpiDat 3.1



Anexo 4. Ejecución de la prueba ELISA indirecto



Anexo 5. Ejecución de la Prueba Fluorescencia Polarizada FPA



