



UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
Laureate International Universities

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“VALIDACIÓN PRELIMINAR DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA “ANIGEN RAPID B BRUCELLA AB TEST” PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRUCELLA ABORTUS EN SUERO BOVINO Y COMPARACIÓN CON LAS PRUEBAS SAT Y RB.”

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía:

Dr. Joar García

Autora:

Andrea Carolina Vela Chiriboga

Año:

2013

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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”.

.....

Dr. Joar García
CI: 1708655475
Médico Veterinario

DECLARACIÓN 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.”

.....

Andrea Vela
CI: 1718312364

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Joar García y al Dr. Jorge Ron, quienes aportaron con su conocimiento, que fue indispensable para la realización de esta investigación.

A mi madre, hermanas y abuelos, quienes me apoyaron incondicionalmente durante todo el proceso.

Al Sr. Francisco Zapata por ser un soporte en todo momento y por la confianza absoluta que depositó en mí.

Al Sr. Erick Cordero por la comprensión, paciencia y por brindarme las facilidades para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa de los mamíferos, causada por bacterias del género *Brucella*, que tiene al humano como hospedador accidental; por lo que es considerada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una de las zoonosis de mayor importancia, a razón de que su distribución es mundial y al gran impacto social, económico y en la salud pública.

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la historia clínica y en la concordancia de los signos clínicos; debido a que estos últimos no son patognomónicos, se debe recurrir al cultivo y aislamiento del agente para realizar un diagnóstico definitivo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a estas bacterias en el Grupo de Riesgo III, siendo de alta peligrosidad el manejo de especímenes contaminados, observando medidas de estricta bioseguridad, por lo que es necesario recurrir a otras herramientas diagnósticas; sin embargo, muchas de las pruebas disponibles necesitan ser realizadas en un laboratorio, requieren de personal capacitado o toma mucho tiempo obtener los resultados. Es por todas estas razones que existe una creciente necesidad de una prueba rápida que pueda ser utilizada a nivel de campo.

Este proyecto tiene por objetivo valorar de forma preliminar la prueba inmunocromatográfica AB- TEST, para el diagnóstico de brucelosis en 58 sueros bovinos de referencia, confirmados positivos y negativos mediante las pruebas Rosa de Bengala, Seroaglutinación en Tubo, Fijación de Complemento, Inmunoensayo enzimático y Aglutinación en Placa y su posterior

evaluación en 80 sueros provenientes de la Encuesta Nacional de Brucelosis y Tuberculosis Bovina, pertenecientes al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador .

Los resultados fueron analizados mediante las pruebas χ^2 , coeficiente Kappa y se determinó el Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) para la validación del ensayo inmunocromatográfico.

Se obtuvo un VPP del 100% y un VPN del 88%, lo que demuestra que es susceptible de arrojar resultados falsos-negativos, por lo que se recomienda utilizar junto con la prueba RB como “screening” para obtener un diagnóstico acertado.

Debido a que existen diferencias significativas entre el AB-TEST y las pruebas antes mencionadas, el inmunoensayo cromatográfico no reemplaza a ninguna de las técnicas diagnósticas oficiales empleadas.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease of mammals caused by bacteria of the genus *Brucella* that has humans as accidental hosts, therefore is considered by the World Organization for Animal Health (OIE) as one of the most important zoonoses, due to its global distribution, the great impact in public health and in social, and economical aspects .

The diagnostic is based on clinical history and consistent clinical signs, but as the latter are not pathognomonic, the isolation of the causal agent is needed to make a definitive diagnosis.

The World Health Organization (WHO) classifies this genus in Risk Group III, as the management of the infected material requires strict biosafety measures, so it is necessary to resort to other diagnostic techniques in serum; however, many of the available tools need to be carried out in a laboratory, require trained personnel or the results are not obtained immediately. For all these reasons there is a growing need for a rapid field test.

The present project aims to assess in a preliminary way the AB-TEST immunochromatographic assay for the diagnosis of brucellosis by using it in 58 bovine reference sera, confirmed positive and negative by Rose Bengal Test, Slow Agglutination Test, Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Complement Fixation Test and Buffered Plate Agglutination Test and its subsequent evaluation in 80 sera from the National Survey of Bovine Brucellosis and Tuberculosis, that belong to the International Zoonoses Centre (CIZ) in Central University of Ecuador (UCE).

The results were analyzed by χ^2 and Kappa coefficient, and for the validation of AB-TEST, the Positive Predictive Value (PPV) and Negative Predictive Value (NPV) were determined.

A PPV of 100% and a NPV of 88% were obtained, these values show that AB-TEST is suitable as a rapid test; however it's likely to yield false-negative results, so, the use of RB as a "screening" test first is recommended to obtain an accurate diagnosis.

Due to the significant difference that exists between AB-TEST and RB, SAT, ELISA, CFT and BPA, the immunochromatographic assay does not replace any of the diagnostic tools normally used.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 ANTECEDENTES	4
1.3 OBJETIVOS	5
2. CAPÍTULO II	7
2.1 ETIOLOGÍA.....	7
2.1.1 Género <i>Brucella</i>	7
2.1.2 Hábitat.....	8
2.1.3 Especies de <i>Brucella</i>	9
2.2 PATOGENIA.....	12
2.2.1 Transmisión.....	12
2.2.2 Respuesta inmunitaria del huésped	13
2.2.3 Supervivencia de la bacteria	17
2.3 SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES EN EL GANADO BOVINO.....	18
2.3.1 En el feto	18
2.3.2 En terneros.....	19
2.3.3 En hembras gestantes	19
2.3.4 En machos	21
2.4 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	21
2.4.1 Métodos directos.....	21
2.4.2 Pruebas serológicas.....	24
2.4.3 Control.....	30
2.4.4 Tratamiento	31
3. CAPÍTULO III	32
3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	32
3.2 MATERIALES	32
3.2.1 De campo.....	32

3.2.2 De laboratorio.....	32
3.3 MÉTODOS.....	33
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	41
4. CAPÍTULO IV	43
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1.1 Sueros de Referencia	43
4.1.2 Sueros provenientes de Encuesta.....	43
4.2 PRUEBA CHI^2	44
4.3 PRUEBA <i>KAPPA</i>	48
4.4 DETERMINACIÓN DE VPP Y VPN	49
5. CAPÍTULO V	51
5.1 CONCLUSIONES.....	51
5.2 RECOMENDACIONES	51
6. REFERENCIAS	52
7. ANEXOS	55

Capítulo I

1.1 Introducción

La brucelosis, también conocida como “fiebre ondulante”, “fiebre del mediterráneo” o “fiebre de Malta”, es una enfermedad esencialmente de los animales, causada por bacterias gram negativas del género *Brucella*, que tiene al humano como hospedador accidental (Corbel, 2006); por lo que es considerada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una de las zoonosis de mayor importancia socioeconómica y sanitaria con gran impacto en la industria ganadera y en el comercio de productos de origen animal (Vadillo et al, 2002).

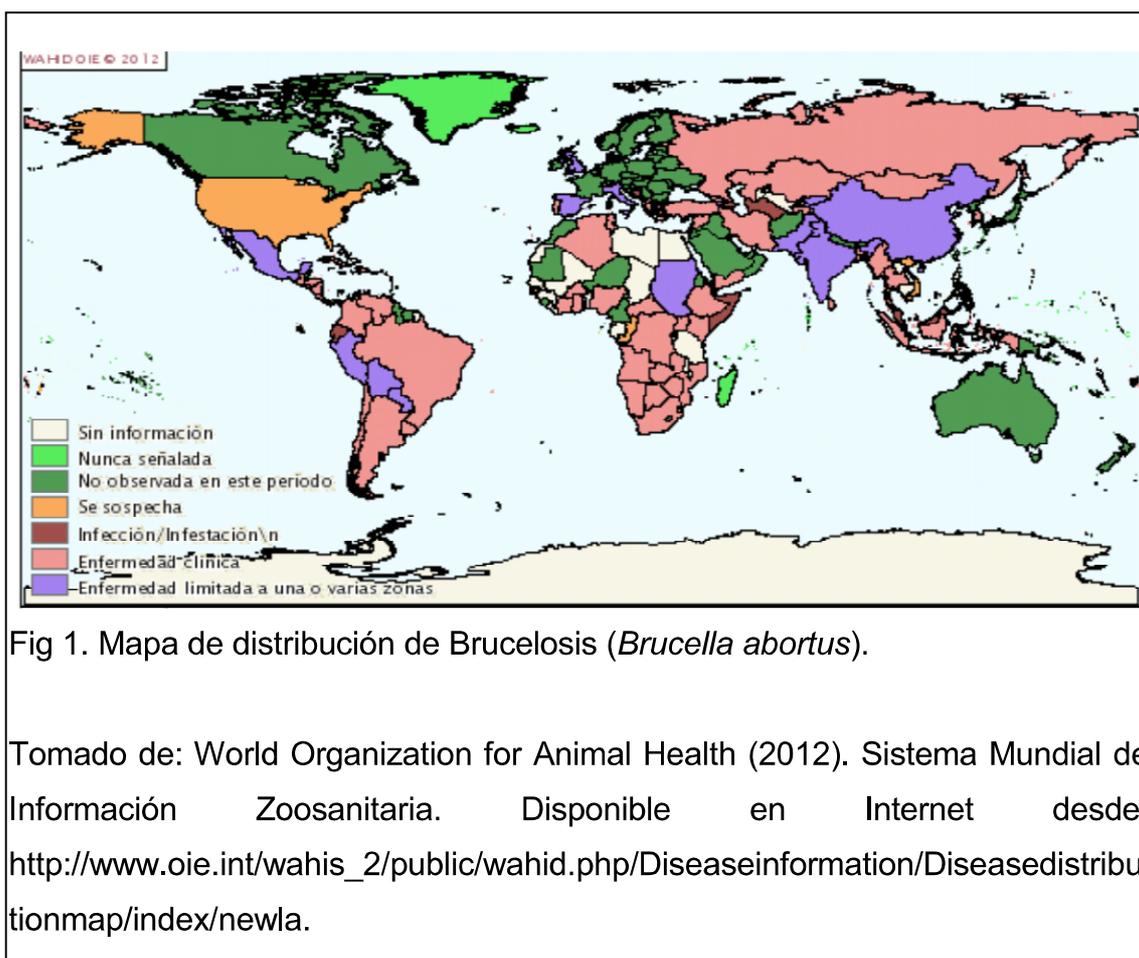
Es una enfermedad aguda o sub-aguda que en los bovinos sexualmente maduros produce placentitis con aborto posterior, generalmente en el último tercio de gestación y orquitis y epididimitis en el macho (Corbel, 2006; Cavalho *et al*, 2010). Sus signos clínicos no son patognomónicos por lo que su diagnóstico se basa en el aislamiento de la bacteria causante, en la identificación de sus antígenos, material genético o de anticuerpos específicos (Nielsen, 2002; Corbel, 2006).

La severidad de la infección depende del sexo, edad, estado sanitario (vacunación), densidad poblacional, número de animales por hato, estado reproductivo, estado inmunológico, resistencia individual, vía de infección, entre otros. Las bacterias se pueden encontrar en los líquidos asociados al parto, leche, sangre, semen, orina, ganglios linfáticos y fetos abortados (Corbel, 2006; Cavalho *et al*, 2010).

La vía más común de contagio es a través del tracto gastrointestinal con su posterior diseminación hacia los nódulos linfáticos, sin embargo otras vías de transmisión incluyen la conjuntiva ocular, abrasiones cutáneas, membranas

mucosas, vía trasplacentaria, el tracto respiratorio o contacto sexual (Cavalho *et al*, 2010).

Su distribución es mundial y legalmente se considera como una enfermedad profesional ya que son los veterinarios, criadores, empleados de camales y laboratoristas la población que se encuentra en mayor riesgo de contaminación (Stanchi *et al*.,2007).



Según el Programa Nacional de Control de Brucelosis realizado por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro (Agrocalidad) en 2009, la distribución de brucelosis bovina en el Ecuador es amplia, con un mayor número de animales infectados en las provincias de Carchi, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Esmeraldas y Loja. La enfermedad se presenta con intensidad variable dependiendo del sistema de producción al que estén sometidos los animales (Torres, 2009).

En el año 2002, se realizó el III Censo Agropecuario en el que se determinó que el Ecuador contaba con 4.485.020 cabezas de bovinos, de los cuales se destinaba un 47.86% a la producción de carne y el 52.14% a la producción lechera, por lo que la presencia de la enfermedad en el país tiene un enorme impacto económico en términos de productividad, eficiencia reproductiva, comercio internacional que se traducen en pérdidas de aproximadamente 5 millones de dólares al año, de los cuales el 21% se debe a la disminución en la producción lechera, 3% por pérdidas en crías y 76% por reposición de madres (Torres, 2009).

El Programa de Sanidad Animal creado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería en el año 1979 definió cinco regiones epidemiológicas:

Región 1 de alta prevalencia: está conformada por las provincias de: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, con una prevalencia que oscila entre 1.97 al 10.62%.

Región 2 de alta prevalencia: está conformada por las provincias de: Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro con una prevalencia de 4.2 a 10.62%.

Región 3 de baja prevalencia: está constituida por las provincias de: Bolívar, Cañar, Azuay y Loja, con una prevalencia de 1.3 a 2.6%.

Región 4 de baja prevalencia: está conformada por las provincias de la Amazonía, de las que no se tuvo información pero se estimó una baja prevalencia debido a los sistemas extensivos de producción.

Región 5 indemne: está conformada por la región insular, islas Santa Cruz, Isabela, Cristóbal y Floreana.

1.2 Antecedentes

Estructuralmente, *B. abortus*, *B. mellitensis* y *B. suis*, contienen lipopolisacárido O (PSO) en su superficie celular y pueden ser diagnosticados serológicamente utilizando el antígeno completo o un lipopolisacárido liso (LPS-S) extraído químicamente. El resto de especies de *Brucella*, tienen lipopolisacárido rugoso (LPS-R) (Nielsen, 2002; Quinn *et al*, 2002).

La respuesta inmunológica a la infección por *B. abortus* en el ganado está inicialmente dominada por inmunoglobulinas de tipo M (IgM) seguida casi inmediatamente por la producción de inmunoglobulinas de tipo G (IgG) IgG1, IgG2 e inmunoglobulinas de tipo A (IgA). Las pruebas serológicas que miden IgM no son muy recomendables puesto que con este anticuerpo se presentan la mayor cantidad de reacciones cruzadas, dando lugar a la aparición de falsos positivos, por lo que las pruebas que miden IgG1 son las más adecuadas (Rebhun, 1995; Nielsen, 2002).

El diagnóstico de brucelosis se basa en la adecuada indagación de la historia clínica y la concordancia de los hallazgos clínicos; sin embargo, la enfermedad puede tener algunas presentaciones atípicas, por lo que el diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria a través de cultivos (Rebhun, 1995; Quinn *et al*, 2002).

El cultivo bacteriano presenta una sensibilidad (Se) entre el 25 y 50% ya que necesario utilizar un medio especial de cultivo, debiendo ser incubados a una temperatura de 37°C en condiciones de anaerobiosis (5-10% CO₂ para la mayoría de las especies) durante un periodo de 5 días (Quinn *et al*, 2002).

Por todas estas dificultades, se hace indispensable utilizar otras herramientas inmuno-diagnósticas en suero o en leche; de todas maneras, muchas de estas pruebas requieren ciertas destrezas, apoyo de un laboratorio o toma mucho tiempo obtener los resultados (Abdoel *et al*, 2008), es por esto que existe una

creciente necesidad de una prueba rápida que pueda ser utilizada a nivel de campo.

Es importante tomar en cuenta que en animales vacunados con el biológico C19, la formación de anticuerpos vacunales interfiere con algunos tipos de pruebas serológicas dificultando la diferenciación de animales clínicamente enfermos de los sanos vacunados (Quinn *et al*, 2002); sin embargo, este problema se puede reducir utilizando pruebas como el Inmunoensayo enzimático competitivo (cELISA) o la prueba de fluorescencia polarizada (FPA) y con el desarrollo y uso de la vacuna RB51, que utiliza cepas rugosas que no contienen lipopolisacárido O en su superficie celular por lo que no provocan reacción de los anticuerpos (Rebhun, 1995; Nielsen, 2002).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General.

- Valorar de forma preliminar la prueba inmunocromatográfica AB-test, para el diagnóstico de brucelosis bovina en campo.

1.3.2 Objetivos específicos.

- Utilizar la prueba AB-test para el diagnóstico de brucelosis bovina en los sueros de referencia pertenecientes al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), de la Universidad Central del Ecuador.
- Comparar los resultados de la prueba AB-test con los resultados obtenidos mediante las pruebas de Seroaglutinación en Tubo (SAT) y Rosa de Bengala (RB) en sueros procedentes de la Encuesta Nacional de Brucelosis y Tuberculosis Bovina realizados por el CIZ.

- Determinar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba inmunocromatográfica AB-test.

Capítulo II

2.1 Etiología

2.1.1 Género *Brucella*

La primera especie de *Brucella* fue identificada y aislada en el año 1887 por Sir David Bruce a partir de tejido esplénico de pacientes que padecían fiebre de Malta en la Isla del mismo nombre, su carácter zoonótico fue demostrado en 1905 gracias del aislamiento de *Brucella mellitensis* de leche de cabra en dicha isla (Seleem *et al*, 2008). Posteriormente, se logró la identificación de otras especies de *Brucella*: *Brucella abortus* en el año 1897 por Bang, *Brucella suis* en 1914 por Traum, *Brucella ovis* en 1950 por McFarlane, *Brucella canis* en 1968 por Carmichael y en 1994 se logra aislar de cetáceos marinos *Brucella spp.*, que posteriormente se llamaría *Brucella maris* (Romero, 2007; Stanchi *et al.*,2007).

En la actualidad el género *Brucella* está constituido por siete especies: *Brucella mellitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*, *Brucella maris* y *Brucella canis*; de igual manera, éstas especies se dividen en biovariedades debido a diferencias genéticas (Vadillo *et al.*, 2002; Carvalho *et al*, 2010).

Las bacterias pertenecientes a este género son cocobacilos gramnegativos, no esporulados, sin cápsula, inmóviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos, ureasa positivos (con excepción de *B. ovis*), oxidasa positivos, (con excepción de *B. ovis* y *B. neotomae*) y su crecimiento en los medios de cultivo es lento (Quinn *et al*, 2002). Poseen una membrana externa que contiene fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS) y una membrana interna, entre las que se encuentra el espacio periplásmico, que contiene proteínas que se han caracterizado como antígenos útiles para el diagnóstico serológico; por último, constan de una región citoplasmática en la que se han identificado proteínas

ribosomales que actúan como antígenos en la respuesta de hipersensibilidad retardada (Vadillo *et al*, 2002; Stanchi *et al.*,2007).

Las cepas de *Brucella* se clasifican como lisas (S) o rugosas (R) de acuerdo al aspecto de sus colonias al cultivo, esto se debe a la expresión del LPS en la superficie bacteriana (Stanchi *et al.*,2007).

El LPS es el antígeno estructural más importante de estas bacterias y consta de una fracción glucolipídica (lípidos A) que se inserta en la membrana externa, un oligosacárido intermedio llamado núcleo y el polisacárido O (PSO), que en conjunto forman el antígeno de superficie responsable de las respuestas inmunológicas (Corbel, 1997; Seleem *et al*, 2008).

Existen dos tipos de LPS: el LPS-S (liso) y LPS-R (rugoso) y se diferencian principalmente porque el LPS-S presenta PSO (Stanchi *et al.*,2007).

2.1.2 Hábitat

En general, son patógenos intracelulares facultativos que tienen preferencia por el sistema fagocítico mononuclear o tejidos que contienen eritritol, un alcohol de cuatro carbonos, ya que son capaces de utilizarlo como fuente de energía (Vadillo *et al.*, 2002; Carvalho *et al*, 2010).

Cada especie bacteriana está adaptada a un hospedador específico entre los animales domésticos; así *B. mellitensis* infecta a cabras y ovejas, *B. abortus* al ganado vacuno, *B. suis* al cerdo, *B. ovis* a los ovinos, *B. canis* a los caninos y *B. neotomae* a roedores; sin embargo, éstas también pueden infectar a animales silvestres como: llamas, vicuñas, alpacas, camellos, bisones americanos y europeos, búfalos africanos, yak, antílopes, etc. (Biberstein & Chung, 1994; Stanchi *et al.*,2007).

El humano es un hospedador accidental; y las principales especies causantes de la enfermedad son *B. mellitensis* en mayor medida, aunque también *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* (Vadillo *et al*, 2002; Stanchi *et al.*,2007).

2.1.3 Especies de *Brucella*

- *B. abortus*: Es el agente causal de la brucelosis bovina aunque también puede infectar a rumiantes menores, cerdos y, de igual manera, es patógena para el ser humano (biovariedad 1), la biovariedad 2 se aísla menos frecuentemente pero su distribución es amplia, la biovariedad 3 ha sido encontrada en India, Egipto y Este de África y la biovariedad 5 únicamente ha sido encontrada en Reino Unido y Alemania (Biberstein & Chung, 1994; Vadillo *et al.*, 2002).
- *B. mellitensis*: Infecta generalmente a ovinos y caprinos, en los que causa abortos, retención de placenta, orquitis, epididimitis, mortinatos o neonatos débiles. Es la especie más difundida a nivel mundial, excepto en Nueva Zelanda, Australia y Norteamérica, y el principal agente en la brucelosis humana. Infecta también al camello, llama, guanaco, vicuña, alpaca, antílope y búfalo doméstico (Vadillo *et al.*, 2002; Stanchi *et al.*, 2007).
- *B. suis*: Propia de los cerdos, de distribución mundial pero de prevalencia baja. Puede ser asintomática o causar una inflamación crónica de los órganos reproductores (ciclos estrales irregulares, camadas pequeñas, abortos, mortinatos o crías débiles, orquitis, infertilidad) y del sistema óseo (artritis y espondilitis) (Vadillo *et al.*, 2002).
Es patógena para los humanos (biovariedades 1 y 3), ganado vacuno (biovariedad 1), rumiantes silvestres de Siberia, Alaska y Canadá (biovariedad 4), aunque lobos, zorros y osos que consumen estos animales infectados, también pueden adquirir la enfermedad y roedores y liebres (biovariedad 3 y 5) (Biberstein & Chung, 1994).
- *B. ovis*: Produce enfermedad en ovinos, cuyo signo clínico más común es la epididimitis acompañada de orquitis (hipertrofia y fibrosis de las partes afectadas) causando fertilidad reducida; mientras que la placentitis, abortos, infertilidad y muerte perinatal ocurren con menos frecuencia. Es de

distribución mundial y no se ha comprobado su patogenicidad en el hombre (Vadillo *et al.*, 2002; Smith, 2010).

- *B. canis*: Causa abortos, muerte fetal, orquitis, epididimitis, discoespondilitis, uveítis y meningoencefalitis en caninos. La transmisión al hombre es esporádica y su distribución es mundial (Biberstein & Chung, 1994; Vadillo *et al.*, 2002).
- *B. neotomae*: se encuentra únicamente en la rata de bosque (*Neotoma lepida*) en la zona del desierto de Utah en Estados Unidos (Biberstein & Chung, 1994).

Tabla 1. Perfil patógeno y hospedadores principales de las especies del género *Brucella*.

Especies	Hospedadores	Enfermedades	Distribución Geográfica
<i>B. abortus</i>	Bovinos y otros bóvidos*	Abortos y orquitis.	1: Mundial.
	Ovejas, cabras y cerdos	Abortos y esporádicos.	2: Mundial.
	Caballos	Asociado a bursitis.	3: India, Egipto, Este de África.
	Ser humano	Brucelosis humana.	5: Gran Bretaña y Alemania.
			El resto de biovariedades no son frecuentes.
<i>B. melitensis</i>	Cabras* y ovejas	Abortos.	En zonas con predominio de

			ganado.
	Bovinos y otros bóvidos	Abortos ocasionales, excreción en leche.	ovino y caprino, con excepción de Nueva Zelanda,
	Ser humano	Brucelosis humana.	Australia y Norteamérica.
<i>B. suis</i>	*Cerdos	Abortos, orquitis, artritis, espondilitis e infertilidad.	Biovariedades 1: Mundial. 2: Oeste y centro de Europa. 3: EE.UU, Argentina y Singapur. 4: Círculo Polar Ártico (Canadá, Alaska y Siberia) en reno y caribú. Nueva Zelanda, Australia y otros
<i>B. ovis</i>	*Ovejas	Epididimitis en machos y abortos esporádicos en hembras.	países de cría y lanar: EE.UU, Rumanía, República Checa y Eslovaquia, África del Sur y América del Sur.

<i>B. canis</i>	*Perros	Abortos, epididimitis, discoespondilitis y esterilidad permanente en hembras.	América del Norte y partes de Europa.
	Humano	Brucelosis humana.	No es común pero está pasando a ser de distribución mundial.
<i>B. neotomae</i>	Ratas del desierto (<i>Neotoma lepida</i>)	No patógena del para las ratas. No se ha identificado en otra especie animal.	EE.UU. (Utah).

*Hospedador preferente.

B. suis biovariedad 1 también es causa de infección en el ganado vacuno.

B. suis biovariedad 3 infecta a la liebre, *B. suis* biovariedad 4 infecta al reno y

B. suis biovariedad 5 infecta a roedores.

Tomado de: Vadillo S., Píriz S., Mateos E (2002). Manual de Microbiología Veterinaria pp (278). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

2.2 Patogenia

2.2.1 Transmisión

La vía más común de infección en el ganado bovino es la gastrointestinal, otras vías de transmisión son: cutáneo, vías respiratorias, transplacentaria y conjuntiva ocular a través de contacto directo con animales infectados, sus

secreciones uterinas, sangre, placentas, fetos abortados, semen, con el medio contaminado o por consumo de productos lácteos infectados no pasteurizados (Vadillo *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2010).

Una vez eliminadas al medio por los animales infectados, las bacterias pueden sobrevivir largo tiempo (hasta 80 días) en ambientes húmedos y fríos, resisten a la congelación y descongelación pero son destruidas por las temperaturas de pasteurización (60°C) y por desinfectantes como cloro, fenol y formol; de este modo los derivados lácteos refrigerados, orina, tejidos fetales, agua fría pueden mantener una capacidad infecciosa prolongada (Rebhun, 1999; Stanchi *et al.*, 2007).

Los neonatos pueden adquirir la infección dentro del útero de la hembra infectada o al nacer, muchos de estos animales aparecerán sanos hasta que inicien su vida reproductiva (Fitch, 2003).

2.2.2 Respuesta inmunitaria del huésped

La respuesta inmune en cada organismo es variable y depende significativamente de la edad, sexo, estado reproductivo (gestación), estado inmunológico (vacunación, exposición previa), dosis infectante, virulencia de la cepa y estado nutricional (Stanchi *et al.*, 2007). De esta manera, los tipos de respuesta pueden ser:

- **Celular:** Estos microorganismos son potentes inductores de la respuesta inmune celular. En primera instancia, son los linfocitos los que reaccionan ante la infección, incluso antes de que exista reacción humoral. Los linfocitos T actúan activando los macrófagos quienes son los que al final controlarán la infección. Hay también participación de neutrófilos y linfocitos citotóxicos CD4 y CD8 en la lisis de células infectadas por *Brucella* (Carvalho *et al.*, 2010).

La invasión y daño tisular inducen la producción de sustancias que son detectadas por los neutrófilos, la primera línea de defensa, y los atraen directamente hacia la fuente (quimiotaxis) (Tizzard, 2002). La fagocitosis de las bacterias inicia con la fase de reconocimiento y fijación con la presencia de opsoninas, las que recubren la superficie del microorganismo neutralizándolo. A continuación, los pseudópodos engloban la bacteria para después unirse entre sí y formar una vacuola fagocítica, a la cual se unirán los lisosomas para dar origen al fagolisosoma (Biberstein & Chung, 1994; Tizzard, 2002).

La destrucción de las bacterias se lleva a cabo mediante procesos enzimáticos y metabólicos:

1. Metabólicos: la explosión respiratoria tiene lugar después de la fagocitosis, el metabolismo celular aumenta junto con el consumo de oxígeno, lo que provoca la oxidación de la glucosa generando sustancias antibacterianas (radicales superóxido que luego se transforman en peróxido de hidrógeno) tóxicas para las bacterias (Biberstein & Chung, 1994; Tizzard, 2002).

2. Enzimáticos: presentes en los gránulos existen enzimas igualmente tóxicas para los microorganismos (colagenasa, elastasa, fosfatasa ácida, lisozima, entre otras), las mismas que actúan sobre los lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos para degradarlos (Biberstein & Chung, 1994; Tizzard, 2002).

La segunda línea de defensa la constituyen los macrófagos, éstos acuden al sitio de la infección debido a la concentración de productos de origen bacteriano, de sustancias producidas por tejidos y células dañadas y por neutrófilos que están en proceso de morir (Tizzard, 2002).

Entre las funciones de los macrófagos se incluyen la destrucción bacteriana por medio de los procesos antes mencionados, eliminación de células y tejido muerto contribuyendo al proceso de restauración, controlan la inflamación, y procesan antígenos para la respuesta humoral específica (Tizzard, 2002).

Cuando existe infección por *Brucella* la respuesta celular aparece a la tercera o cuarta semana después de la infección y puede persistir por varios años (Godfroid *et al.*, 2010).

Para la inducción de la respuesta humoral, se requiere la fragmentación y procesamiento del antígeno, por lo que existen glicoproteínas especializadas llamadas moléculas de histocompatibilidad que forman el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) encargadas de realizar estas funciones (Tizzard, 2002).

- Humoral: Las inmunoglobulinas (Ig) son sustancias de naturaleza proteica existentes en el suero y algunas secreciones, éstas son producidas por los linfocitos B. Están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas (dos ligeras y dos pesadas) y el papel que desempeñan estas proteínas es la inactivación y eliminación del antígeno (Tizzard, 2002).

Existen 5 clases o isotipos de inmunoglobulinas, dependiendo del tipo de cadena pesada que se encuentre en su estructura, siendo IgG e IgM las de mayor importancia en esta enfermedad:

Tabla 2. Clases y subclases de inmunoglobulinas en los animales domésticos.

Especie	IgM	IgG	IgA	IgE
Perro	+	G ₁ , G _{2a} , G _{2b} , G _{2c}	+	+
Gato	+	G ₁ , G ₂	+	?
Bóvido	+	G ₁ , G ₂ G _a , G _b , G _c , G(B),	+	+
Caballo	+	G(T)	+	+
Óviedo	+	G ₁ , G ₂	A ₁ , A ₂	+
Cerdo	+	G ₁ , V, G ₂ , G ₃	A ₁ , A ₂	+

*La IgD no ha sido identificada en ninguna de estas especies.

Tomado de: Biberstein E., Chung Y. (1994). Tratado de Microbiología Veterinaria pp(16). Zaragoza: Editorial Acribia.

1) IgG: Es una glicoproteína que se encuentra en los espacios tisulares y constituye aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes del total de anticuerpos séricos. En muchas especies se han identificado subclases de IgG debido a un ligero cambio en su cadena de aminoácidos, lo que hace igualmente, que cambie su función biológica (Biberstein & Chung, 1994).

Este anticuerpo es capaz de unirse a dos determinantes antigénicos al mismo tiempo (bivalente), lo que la capacita para participar en reacciones de aglutinación y precipitar el antígeno (Biberstein & Chung, 1994).

2) IgM: Este anticuerpo es el primero en aparecer en el suero en la respuesta inmune. Es el principal receptor de antígenos y puede existir en forma de monómero o de pentámero, pudiendo fijar hasta 10 antígenos, lo que

lo hace eficiente en la formación de complejos inmunes y en su precipitación (Biberstein & Chung, 1994).

En el caso de una infección por *Brucella*, hay una producción primaria de IgM, la que alcanza su nivel máximo a la segunda semana post-infección y desaparece después de pocos meses, se continúa con la producción de IgG (IgG1, IgG2) a la tercera o cuarta semana después de la exposición, llegan a su pico más alto entre el primer y segundo mes después de la exposición y pueden persistir hasta por varios años (Rebhun, 1999; Godfroid *et al.*, 2010).

El LPS de estos microorganismos no es pirógeno, no activa la cascada de complemento y es mal inductor de citoquinas inflamatorias (Stanchi *et al.*, 2007; Seleem *et al.*, 2008).

2.2.3 Supervivencia de la bacteria

Una vez dentro del organismo del hospedador, las bacterias invaden primero los nódulos linfáticos (retrofaríngeos, parotídeos, submaxilares, iliacos, retromamarios), en donde se multiplican y posteriormente viajan por vía linfática y sanguínea hacia los órganos ricos en células retículoendoteliales como son: hígado, bazo, linfa, médula ósea y riñones (Merchant *et al.*, 1980). Es fundamental para su crecimiento, la existencia de eritritol, presente en la placenta de hembras gestantes, glándula mamaria, útero y epidídimo. Dicha preferencia da lugar a abortos, metritis crónicas, esterilidad, o epididimitis en los animales que padecen esta enfermedad (Vadillo *et al.*, 2002; Carvalho, *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, son parásitos intracelulares facultativos, por lo que pueden vivir dentro o fuera de la célula hospedadora; sin embargo, tienen una preferencia por los fagocitos (polimorfonucleares y macrófagos) debido a que este tipo de células constituyen un factor importante en la

resistencia de la *Brucella* al sistema inmunitario del hospedero y a los antibióticos (Vadillo *et al.*, 2002).

Las cepas lisas tienen más facilidad para invadir las células de hospedador, lo que sugiere que el PSO, juega un papel importante en esta característica ya que inhibe la apoptosis celular y así evita una respuesta humoral agresiva y le permite la supervivencia dentro de los macrófagos (Seleem *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010) debido a que es capaz de evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma, inhibiendo la degranulación y produciendo una falla en los sistemas no oxidativos; en su lugar, se fusiona con la membrana del retículo endoplasmático, donde se multiplica (Tizzard, 2002; Costa *et al.*, 2008).

De igual manera, los mecanismos oxidativos de explosión respiratoria fallan puesto que las enzimas superóxido dismutasa y catalasa se agregan al mecanismo de defensa de los microorganismos ante la toxicidad oxidativa (Vadillo *et al.*, 2002; Seleem *et al.*, 2008).

La replicación bacteriana en las células trofoblásticas está altamente influenciada por la etapa de gestación, siendo mayor en el último tercio ya que es ahí donde las células secretan activamente hormonas esteroideas (Carvalho *et al.*, 2010).

La bacteria es capaz de modular la secreción de prostaglandinas para favorecer su crecimiento, adicionalmente provoca cambios en la producción de hormonas de la placenta; así hay un aumento de los niveles de prostaglandina F_{2α}, cortisol y estrógenos, conjuntamente con una disminución de los niveles de progesterona, simulando lo que ocurre durante el parto, lo que contribuye a que se produzca el aborto (Biberstein & Chung, 1994; Carvalho *et al.*, 2010).

2.3 Signos clínicos y lesiones en el ganado bovino

2.3.1 En el feto

La lesión que se encuentra más comúnmente en fetos abortados es una pleuroneumonía, también es posible observar pericarditis, peritonitis, hipertrofia de los linfonodos iliacos, bronquiales y hepáticos y hemorragias petequiales en el timo, grados variables de edema subcutáneo, líquido serosanguinolento en las cavidades torácica y abdominal y contenido turbio amarillento en el abomaso. El hígado aparece agrandado, de aspecto poco homogéneo y con focos necróticos (Stanchi *et al*,2007; Carvalho *et al*, 2010).

2.3.2 En terneros

Se cree que los animales jóvenes son resistentes a la enfermedad debido a los anticuerpos que reciben del calostro; sin embargo, los neonatos pueden infectarse vía intrauterina o a través del consumo de leche contaminada (Rebhun, 1999).

Estos animales son serológicamente negativos y asintomáticos, pero al iniciar su vida reproductiva pueden abortar o parir crías infectadas, dando origen a la brucelosis latente (Stanchi *et al*,2007; Carvalho *et al*, 2010).

2.3.3 En hembras gestantes

Durante la gestación, los microorganismos invaden primeramente las células trofoblásticas ubicadas en la base de las vellosidades del corion desde donde se diseminan hacia los trofoblastos intercotiledonarios produciendo su ulceración, endometritis debido a la infiltración de células inflamatorias, vasculitis y necrosis del alantocorion, comprometiendo el intercambio de metabolitos entre madre y cría. En caso de primoinfección, el proceso termina en aborto en el último tercio de la gestación. Como secuela se produce retención placentaria y metritis (Carvalho *et al*, 2010; Rebhun, 1999).

En gestaciones siguientes, se observan menos abortos aunque las hembras quedan infectadas y liberan bacterias con cada parto (Rebhun, 1999; Stanchi *et al*,2007).

Otros signos son: producción disminuida de leche con aumento de células somáticas y poca eficiencia reproductiva. (Carvalho *et al*, 2010).

2.3.4 En machos

En el macho, la enfermedad se caracteriza por signos de infección sistémica como son fiebre y anorexia, orquitis con necrosis del parénquima, epididimitis, prostatitis, (lo que provoca infertilidad), en ocasiones también puede existir artritis y sinovitis representadas por la presencia unilateral o bilateral de higromas, especialmente en la articulación del carpo; aunque en la mayoría de los casos la enfermedad puede ser inaparente (Biberstein & Chung, 1994; Carvalho *et al.*, 2010).

2.4 Diagnóstico y tratamiento

2.4.1 Métodos directos

- Análisis microbiológico:

El cultivo bacteriológico constituye la prueba de oro para el diagnóstico, pero, debido al costo y a que son indispensables los conocimientos y destrezas especializados, no se constituye en un método diagnóstico muy comúnmente utilizado (Rebhun, 1999; Godfroid *et al.*, 2010).

Las muestras son sembradas directamente en medios sólidos enriquecidos con aminoácidos y vitaminas que faciliten el crecimiento y el aislamiento, puede utilizarse agar suero-dextrosa, agar tripticasa-soya, agar glicerol-dextrosa o agar sangre suplementado con 2-5% de suero equino o bovino (Merchant *et al.*, 1980; Vadillo *et al.*, 2002).

En vista de que los especímenes de origen animal generalmente se encuentran contaminados con varias especies de microorganismos, se recomienda usar medios selectivos que cubran las necesidades nutricionales de *Brucella* junto con una serie de antibióticos que inhiban el crecimiento de bacterias no

deseables, los más usados son: polimixina B, bacitracina, ácido nalidíxico, nistatina y vancomicina (Merchant *et al.*, 1980; OIE, 2004).

Las muestras válidas para el cultivo incluyen fetos abortados (estómago, bazo o pulmón), membranas fetales, secreciones vaginales, calostro, leche, semen, linfonodos y fluido procedente de articulaciones artríticas o higromas (Godfroid *et al.*, 2010).

Se recomienda incubar el medio de cultivo en una atmósfera enriquecida con 5-10% de CO₂ en un rango de temperatura de 20-40°C, siendo la óptima 37°C y un pH de 6.8-7.2 (Biberstein & Chung, 1994; Vadillo *et al.*, 2002).

Aunque las colonias son generalmente visibles a los 7-14 días, es recomendable mantener los cultivos por un periodo de tres semanas antes de que sean considerados negativos (Biberstein & Chung, 1994; Vadillo *et al.*, 2002).

Es necesario diferenciar colonias lisas de rugosas ya que todas las cepas pueden desarrollar una variación lisa-rugosa (S-R).

Las colonias lisas (S) son pequeñas, de aspecto homogéneo, circulares, de color gris blanquecino y traslúcidas; mientras que las colonias rugosas (R) son de mayor tamaño, menos transparentes, de aspecto granuloso y superficie mate (Vadillo *et al.*, 2002).

Para la identificación de las diferentes biovariedades, se deben realizar pruebas como son la producción de ureasa, exigencia de CO₂, producción de SH₂, prueba de catalasa y oxidasa y es importante realizar la diferenciación entre cepas patógenas y cepas vacunales (Rebhun, 1999), a continuación se detallan las características de cultivo de cada una de las biovariedades:

Tabla 3. Diferenciación de especies y biovares de *Brucella* mediante métodos determinativos convencionales.

Especies y biovares	Nec. CO ₂	Prod. CO ₂	Ureasa	Crecimiento en presencia de fuscina básica y tionina			Serología: Absorción de antisuero mono específico		Lisis por cepa fágica		
				20	20	40	(Conc. En ug/ml de medio)		3		
							<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	RTD10	⁴ RTD	
<i>B. abortus</i>											
	1	+,-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
	2	+,-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
	3	+,-	+	+		+	+	+	-	+	+
	4	+,-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	5	-	+,-	+	+	+	-	-	+	+	
	6	-	+,-	+	+	+	-	+	-	+	+
	7	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	9	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>B. melitensis</i>											
	1	-	-	d	+	+	-	-	+	-	-
	2	-	-	d	+	+	-	+	-	-	-
	3	-	+	d	+	+	-	+	+	-	-
<i>B. suis</i>											
	1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
	2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	3	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. ovis</i>											
		+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. neotomae</i>											
		-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>B. canis</i>											
		-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

*Nota: Todas son catalasa positivas, todas excepto *B. neotomae* y *B. ovis* son oxidasa positivas, y todas excepto *B. canis* y *B. ovis* reducen nitrato a nitrito.

Tomado de: Biberstein E., Chung Y. (1994). Tratado de Microbiología Veterinaria pp(289). Zaragoza: Editorial Acribia.

- Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR): Se basa en la detección de secuencias de genes específicos de *Brucella spp.* Existen varios protocolos para la realización de estas pruebas; sin embargo, estos métodos demuestran ser menos sensibles que el cultivo bacteriano aunque son muy específicos, por lo que es recomendable combinar las dos técnicas para obtener un mejor diagnóstico (Godfreid *et al.*, 2010).

Para la diferenciación entre las diferentes especies de *Brucella* se utiliza el PCR AMOS (abortus, mellitensis, ovis, suis); sin embargo, no identifica las diferentes biovariedades. De igual manera, esta técnica permite diferenciar las cepas de campo de las cepas vacunales (Godfreid *et al.*, 2010).

2.4.2 Pruebas serológicas

Cuando el diagnóstico bacteriológico no es posible, es necesario basarse en métodos que valoren la respuesta inmunológica del animal infectado. Estas pruebas detectan los anticuerpos producidos como reacción al antígeno completo o al LPS-S (McGiven *et al.*, 2003; Godfreid *et al.*, 2010).

El protocolo a seguir para el diagnóstico serológico es emplear en primer lugar una prueba rápida tamiz o “screening” que identifique los animales seropositivos y utilizar posteriormente una prueba más específica que asegure los verdaderamente positivos (Vadillo *et al.*, 2002; McGiven *et al.*, 2003).

Las pruebas más utilizadas para el diagnóstico serológico son:

- Pruebas de aglutinación:

1. Aglutinación en tubo (SAT): Detectan anticuerpos aglutinantes, IgM, en un pH neutro o ligeramente ácido, por lo que son susceptibles a la producción de falsos positivos por reacciones cruzadas. Utiliza células de *Brucella abortus* como antígeno, se mezcla con suero y se observa el porcentaje de aglutinación (Nielsen, 2002). A una concentración óptima de antígeno y de anticuerpos, se forman grandes complejos antígeno-anticuerpo que se precipitan al fondo del tubo y son evaluados de acuerdo al porcentaje de aglutinación (25%, 50%, 75%) y transformados a unidades internacionales por mililitro (UI/ml). Es una prueba lenta ya que requiere incubación a 37°C por un periodo de 20 horas. Se puede realizar en tubos o microplacas y deben realizarse al menos 3 diluciones por cada suero problema (OIE, 2004; Godfroid *et al.*, 2010).

Debido a su relativa falta de sensibilidad y especificidad no es recomendada por la OIE para diagnóstico; sin embargo, es ampliamente utilizada puesto que se ha logrado aumentar su especificidad mediante varios métodos como son: añadir un agente quelante como EDTA, aumentar la temperatura del suero problema, aumentar la cantidad de cloruro de sodio utilizada en la preparación del antígeno o la adición de antiglobulina; para reducir la cantidad de reacciones cruzadas y así los resultados falso positivo (Nielsen, 2002; Godfroid *et al.*, 2010).

2. Antígenos acidificados: representados por la prueba rosa de bengala (RB) y aglutinación en placa (BPAT), son pruebas rápidas, cuyos resultados son leídos a los 4 minutos. Se realizan a un pH de 3.75, lo que reduce la aglutinación de IgM y estimula la aglutinación de IgG, disminuyendo la producción de resultados inespecíficos. Ambas pruebas utilizan células completas de *Brucella abortus* teñidas con un colorante (rosa de bengala o cristal violeta en caso de BPAT) (Nielsen, 2002). Estas pruebas son sencillas de realizar, relativamente baratas y aptas para utilización en animales individualmente. Las desventajas de estas pruebas son las posibilidades de resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con anticuerpos vacunales, o falsos negativos debido al efecto prozona (efecto en el que no existen reacciones de aglutinación ni precipitación por exceso de antígeno o

anticuerpo), por lo que es necesario realizar pruebas confirmatorias. Son recomendadas como pruebas “screening” (OIE, 2004; Godfroid *et al.*, 2010).

3. Precipitación con rivanol (RIV): el rivanol es mezclado con el suero para provocar la precipitación de glicoproteínas de alto peso molecular. Este precipitado es removido, centrifugado y luego se utiliza una prueba rápida de aglutinación a diferentes concentraciones (1:25, 1:50, 1:100, 1:200). Esta prueba es laboriosa y generalmente se utilizaba como prueba confirmatoria; sin embargo, en la actualidad está en desuso (Nielsen, 2002).

4. Agentes reductores: ditioneitol (DTT) y 2 mercaptoetanol (2ME) son agentes reductores que reducen IgM a monómeros, por lo que interfieren con su capacidad para aglutinarse. Estos agentes se añaden al suero en las mismas diluciones utilizadas en la prueba RIV y se utiliza el mismo antígeno que en la prueba SAT, incubado a 30°C por 18 horas (Nielsen, 2002) Estos productos aumentan la sensibilidad de la prueba pero pueden dar lugar a falsos negativos puesto que también pueden evitar la aglutinación de IgG o falsos positivos por la reacción con anticuerpos vacunales. Generalmente, se usaban como pruebas confirmatorias; de igual manera que RIV, ahora están en desuso por la toxicidad de los agentes (Nielsen, 2002).

- Fijación de complemento (CFT): es una prueba que detecta anticuerpos IgG anti-*Brucella* capaces de activar el complemento (Godfroid *et al.*, 2010).

Consiste en la adición de un complemento y un antígeno en concentraciones conocidas a una cantidad determinada de suero. Si los anticuerpos están presentes, se unirán al antígeno dando como resultado la fijación del complemento. Después se añade un factor indicador que se compone de eritrocitos de ovinos sensibilizados con hemolisina. Si existió el anticuerpo, el complemento no estará disponible y la hemólisis no tendrá lugar; caso contrario, se dará la lisis de las células, lo que liberará hemoglobina que posteriormente se mide con un espectrofotómetro o de manera visual simplemente (Nielsen, 2002).

Es una técnica compleja que requiere un gran número de reactivos correctamente titulados, no tiene la capacidad de diferenciar anticuerpos vacunales y está siendo rápidamente sustituida por ELISA; sin embargo, está recomendada como prueba confirmatoria (OIE, 2004).

- Pruebas de precipitación: se utiliza la inmunodifusión en gel agar (AGID) y la inmunodifusión simple radial (SRD), para ellas se utiliza un antígeno llamado polisacárido B compuesto de una molécula glucosa y una mínima cantidad de PSO, derivados de *Brucella mellitensis* que se incorpora al gel agar (SRD) o se coloca dentro de una muesca que se realiza en el gel (AGID), seguidamente, se coloca el suero en una muesca adyacente a la anterior. Si el anticuerpo está presente, se formará un anillo (SRD) o una línea (AGID) de precipitado después de un periodo apropiado de incubación (Nielsen, 2002). Estas pruebas tienen la capacidad de distinguir los anticuerpos vacunales de los producidos por infección pero son insensibles, por lo que no se recomiendan para el diagnóstico (Nielsen, 2002).

- Radioinmunoensayo (RIA): Mide IgG. Se utiliza un antígeno aglutinante de *B. abortus* un pH de 7.2, un diluyente compuesto de albúmina bovina y anticuerpos purificados procedentes de suero bovino marcados con Yodo-125 al que se le añade el suero problema (Chapel *et al*, 1982). Se han desarrollado una gran variedad de pruebas que utilizan radioisótopos para el diagnóstico pero debido a los grandes problemas que conlleva el uso de grandes cantidades de esta sustancia, son pruebas muy poco difundidas (Nielsen, 2002).

- Inmunoensayo enzimático

1. Inmunoensayo enzimático indirecto (iELISA): identifica IgM. Se utiliza una matriz de poliestireno cubierto con LPS-S purificado como antígeno a la que se añade el suero en varias diluciones, EDTA o EGTA para reducir el ligamiento a proteínas séricas inespecíficas y un reactivo antiglobulina conjugado con una

enzima (generalmente fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano HRP). Se coloca un suero control positivo fuerte, uno positivo débil y uno negativo para ayudar en la lectura de los resultados, que se expresan en porcentaje de reactividad con respecto al suero control fuerte positivo (Nielsen, 2002). Es una prueba muy sensible pero no tan específica pero no tiene la capacidad de distinguir los anticuerpos vacunales de los producidos por la infección y da lugar a reacciones cruzadas por lo que se recomienda como prueba “screening” (OIE, 2004).

2. Inmunoensayo enzimático competitivo (cELISA): es capaz de diferenciar anticuerpos vacunales y el principio de esta prueba se basa en que dichos anticuerpos tienen menor afinidad que los anticuerpos producidos por infección real debido a una menor exposición al antígeno, por lo que se selecciona un anticuerpo competitivo (anticuerpo monoclonal) que inhiba la unión de estos anticuerpos vacunales (Nielsen, 2002). Se utiliza LPS-S en una matriz de poliestireno incubado con el anticuerpo competitivo y las diluciones de suero, posteriormente se añade la enzima y un cromógeno. Al igual que iELISA, se colocan sueros control y un búffer que no contiene suero y los resultados se expresan en porcentaje de reactividad con respecto al búffer (Nielsen, 2002).

Tienen alta especificidad pero su sensibilidad es menor que la de cELISA y es una prueba recomendada por la OIE para el comercio internacional (OIE, 2004; Godfroid *et al.*, 2010).

- Ensayo de fluorescencia polarizada (FPA): se puede utilizar como prueba rápida en campo y se basa en qué tan rápido una molécula gira en un medio líquido. Las moléculas pequeñas giran más rápido y tienen mayor capacidad de despolarizar un rayo de luz polarizada, mientras que las moléculas grandes son más lentas y menos capaces de despolarizar la luz. Esta prueba mide el grado de despolarización de dicha luz. Se utiliza un antígeno con un fragmento de lipopolisacárido O y fluoresceína que se incuban por un tiempo de 2 minutos y se analiza la fluorescencia del suero diluido con un analizador de fluorescencia polarizada (Nielsen, 2002). En presencia de anticuerpos

específicos se forman grandes complejos fluorescentes, en pruebas negativas, el antígeno no forma complejos por lo que las moléculas giran más rápido y causan mayor despolarización. Se puede realizar en cualquier parte si se cuenta con un analizador portátil y se puede efectuar en leche, suero o sangre entera. Es una prueba simple, rápida, relativamente barata y recomendada por la OIE para el diagnóstico de brucelosis (OIE, 2004; Godfroid *et al.*, 2010).

Tabla 4. Sensibilidad y Especificidad de pruebas indirectas para el diagnóstico de brucelosis en el ganado bovino, como se ha publicado en la literatura.

Pruebas	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Serológicas		
SAT	81.5	98.9
CFT	90.0 - 91.8	99.7 - 99.9
BPAT	87.0	97.8
iELISA	97.2	97.1 - 99.8
cELISA	95.2	99.7
FPA	96.6	99.1

Tomado de: Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010). Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* 51. 300.

Las sensibilidades y especificidades varían dependiendo de la vía de infección, dosis infectante, presencia o no de bacterias que causen reacciones cruzadas, la respuesta inmune del animal y vacunación previa (Godfroid *et al.*, 2010).

Para un diagnóstico adecuado, es necesario tomar en cuenta la mecánica de la respuesta inmune para esta enfermedad en el ganado bovino y el principio de cada una de las pruebas, lo que permitirá la diferenciación entre una etapa aguda o crónica de la infección; así, la presencia conjunta de IgG e IgM es

sugerente de enfermedad aguda, mientras que la enfermedad crónica es representada por la sola presencia de IgG (Godfroid *et al.*, 2010).

2.4.3 Control

La vacunación de animales jóvenes y la eliminación de animales adultos infectados contribuyen significativamente en la reducción de la enfermedad.

La vacuna más ampliamente utilizada para el control es la C19, una vacuna viva que se aplica de forma subcutánea en hembras entre los 3 y 6 meses de edad. Esta vacuna induce una respuesta inmune adecuada para resistir una infección moderada por una cepa de campo (OIE, 2004).

Es importante mencionar que su utilización en animales adultos puede producir abortos, eliminación de la cepa vacunal en leche y persistencia de anticuerpos en la sangre, lo que complica el diagnóstico serológico debido a que muchas de las pruebas utilizadas rutinariamente no son capaces de diferenciarlos de los anticuerpos producidos por una infección real (Rebhun, 1999; OIE, 2004).

Por estas complicaciones, que se han desarrollado vacunas vivas a partir de cepas rugosas de *B. abortus* (RB51) que carecen de LPS O, lo que evita la producción de anticuerpos en contra de éste determinante antigénico y permite la diferenciación de animales vacunados de animales clínicamente enfermos (Rebhun, 1999; Corbel, 1997).

Las prácticas de manejo son un factor fundamental que influye en la difusión de la enfermedad; así, la utilización de corrales de maternidad contribuye a disminuir la exposición a la bacteria. Los toros infectados, raramente transmiten la enfermedad durante la monta natural; sin embargo, éstos no deben ser utilizados como reproductores. La utilización de inseminación artificial sí supone un mayor riesgo, por lo que es indispensable la adquisición de semen proveniente de animales certificados libres de brucelosis (Biberstein & Chung, 1994).

El tamaño del rebaño también juega un papel importante, ya que en rebaños más grandes, el porcentaje de animales infectados es significativo debido a una mayor oportunidad de contacto y a la introducción de animales de reemplazo en números considerables, por lo que la enfermedad tiende a persistir y su erradicación se complica (Biberstein & Chung, 1994).

2.4.4 Tratamiento

El uso combinado de antibióticos como oxitetraciclina y estreptomina reduce la eliminación de la bacteria por parte de los animales enfermos y en algunos podría eliminar, así mismo, la infección; sin embargo, la utilización de esta alternativa es poco usada puesto que los programas de erradicación contemplan la eliminación o sacrificio de los animales infectados (Smith, 2010).

Capítulo III

3.1 Ubicación geográfica

La presente investigación se realizó en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), una institución ubicada en la Ciudadela Universitaria, Edificio Clínica Universitaria, Tercer Piso, en la parroquia Santa Prisca, ciudad de Quito, Provincia de Pichincha, que pertenece a la Universidad Central del Ecuador (UCE); que, junto con el Instituto de Medicina Tropical de Amberes en Bélgica, la Universidad de Limoges en Francia, el Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana en Cuba y el Centro McGuire en Estados Unidos realizan investigaciones para el control y la erradicación de las principales enfermedades zoonóticas existentes en el país, con el fin de capacitar a los profesionales y proporcionar herramientas diagnósticas adecuadas (UCE, 2004).

3.2 Materiales

3.2.1 De campo

- Overol
- Botas de caucho
- Guantes de látex
- Agujas 18G
- Jeringuillas 5 ml
- Tubos Vacutainer
- Cooler
- Marcador

3.2.2 De laboratorio

- Mandil

- Guantes de látex
- Refrigerador
- Sueros
- Pipetas Eppendorf
- Puntas plásticas para pipetas
- Vórtex
- Placa de vidrio alveolada
- Reactivo Rosa de Bengala
- Palillos
- Agitador automático
- Suspensión de *Brucella abortus*
- Tampón SAT
- Microplacas de Aglutinación
- Incubadora
- Lámpara
- Espejo
- Lupa
- Papel absorbente
- Kit AB-test
- Registros
- Lápiz
- Cronómetro

3.3 Métodos

Pruebas serológicas:

1. Rosa de Bengala: Consiste en la utilización de un antígeno compuesto por células completas de *Brucella abortus* teñidas con el colorante Rosa de Bengala a un pH de 3.65 para evitar la aglutinación de IgM y eliminando así la posibilidad de reacciones inespecíficas (Araj, 2010; Matope *et al*, 2011). Se coloca en una placa una cantidad igual de suero y de reactivo mezclado

(30 μ L), y llevado a temperatura ambiente, se homogeniza por 4 minutos (Díaz *et al*, 2011; Matope *et al*, 2011).

Técnica descrita por la OIE (OIE, 2004):

- Llevar los sueros problema y el antígeno a temperatura ambiente y homogenizar (18-26°C).
- Colocar 30 μ L de suero en una placa de vidrio.
- Agitar suavemente el recipiente que contiene antígeno y colocar una cantidad igual a la de suero en cada placa.
- Inmediatamente después de colocar la última gota de antígeno, mezclar minuciosamente los dos componentes hasta formar una superficie circular de aproximadamente 2cm de diámetro.
- La placa debe ser colocada en una agitadora automática a temperatura ambiente por 4 minutos.
- Leer las placas inmediatamente después de los 4 minutos. Cualquier signo de aglutinación es considerado positivo.

Interpretación de resultados:

La prueba se considera positiva si existe aglutinación visible y negativa si no existe aglutinación visible.



Fig 2. Interpretación de Resultados Rosa de Bengala.

Tomado de: Mantilla A. (2013). Pruebas de Aglutinación. Presentación Power Point.

2. Seroaglutinación en tubo: Consiste en una suspensión bacteriana disuelta en solución salina 0.85% y fenol 0.5% a un pH 7.2, se puede añadir EDTA a la suspensión para reducir los resultados falsos-positivos. Se diluye esta suspensión con suero en proporciones conocidas y son posteriormente incubadas por 20 horas a una temperatura de 37°C. El grado de aglutinación se denota en unidades internacionales (UI) por mililitro (ml), un suero que presente más de 30 UI/ml se considera positivo (OIE, 2004; Araj, 2010).

Técnica descrita por CIZ (CIZ, 2012)

- Colectar 3-4 ml de sangre venosa.
- Dejar reposar hasta la formación del coágulo.
- Centrifugar la muestra para obtener el suero.
- Colocar 168 µL de tampón SAT en la cúpula 1, y 100 µL en las cúpulas 2 a 12 de la microplaca.
- Colocar 32 µL de suero a investigar en la cúpula 1 y mezclar el contenido.
- Realizar el procedimiento anterior sucesivamente hasta la cúpula 12.
- Colocar 100 µL de antígeno en toda la placa.
- Incubar a 37°C en una caja plástica con ambiente húmedo por 20 horas.

Pasos	Cúpulas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T-SAT- EDTA	168	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suero a investigar	32											
Paso de dilución	100											
T - Ag - SAT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Fig. 3. Preparación de las diluciones para la prueba SAT.

Tomado de: Centro Internacional de Zoonosis (2012). Manual de procedimientos para la composición y preparación de los medios y reactivos para la bacterioscopía, aislamiento, identificación y biotipificación de *Brucella* a partir de muestras biológicas. Quito, Ecuador.

Interpretación de resultados:

Un resultado positivo (+) es aquel en que la mezcla de antígeno - suero es clara y una agitación moderada no deshace los grumos formados.

Un resultado incompleto (I) es aquel en que la mezcla de antígeno - suero es parcialmente clara y una agitación moderada no deshace los grumos formados.

Un resultado negativo (-) es aquel en que la mezcla de antígeno-suero es oscura y sin grumos.



Fig. 4 Interpretación de Resultados Micrométodo SAT.

Tomado de: Mantilla A. (2013). Presentación Power Point.

Tabla 5. Relación entre el grado de traslucidez, dilución del suero a investigar y Unidades Internacionales de Aglutinación/ml, según diluciones del suero control positivo.

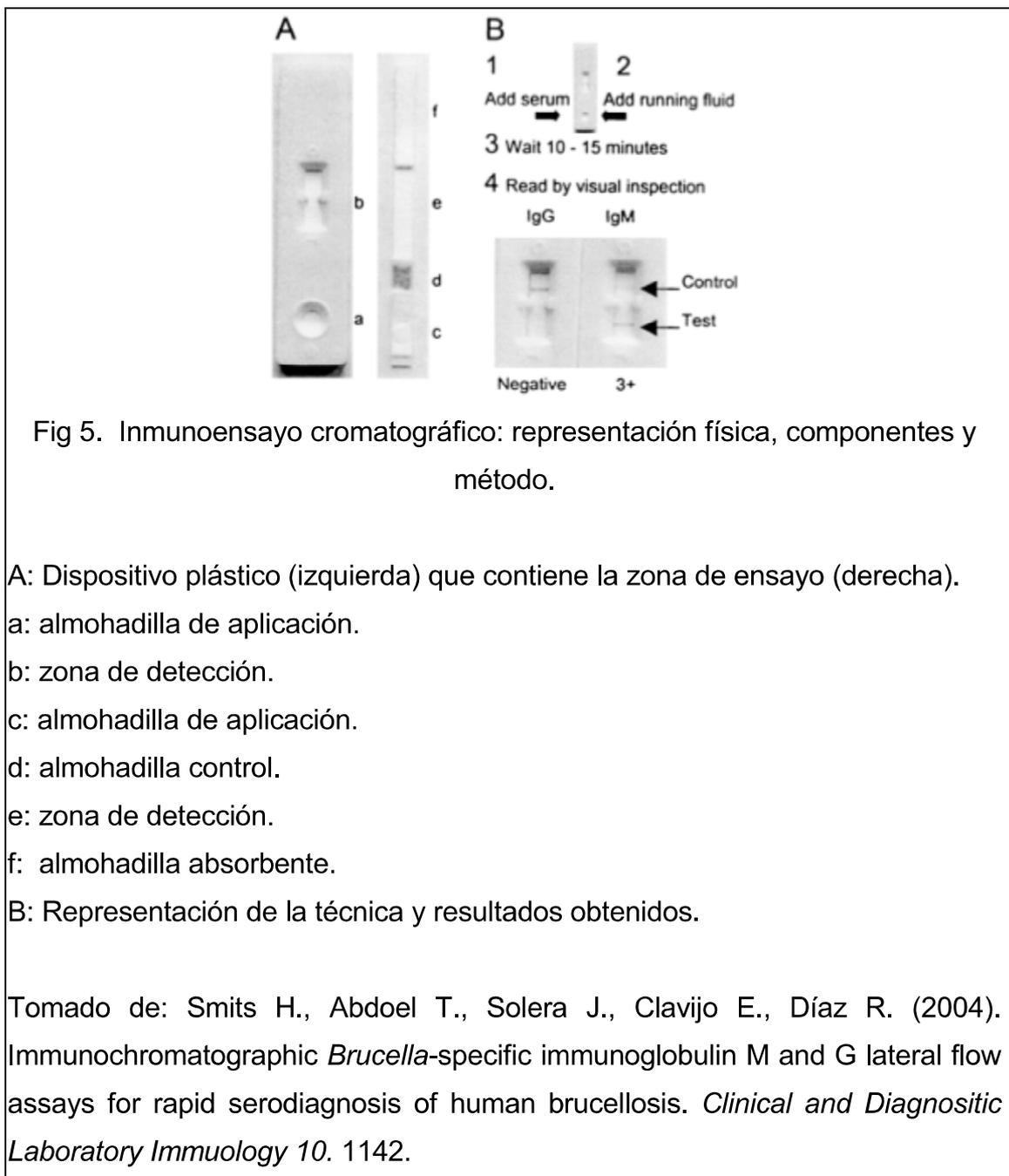
Porcentaje de traslucidez de la muestra
UI: Unidades Internacionales de Aglutinación

Dilución del suero	25%	50%	75%
1/12.5	15 UI	20 UI	25 UI
1/25	30 UI	40 UI	50 UI
1/50	60 UI	80 UI	100 UI
1/100	120 UI	160 UI	200 UI
1/200	240 UI	320 UI	400 UI

1/400	480 UI	640 UI	800 UI
1/800	960 UI	1280 UI	1600 UI
1/1600	1920 UI	2560 UI	3200 UI
1/3200	3840 UI	5120 UI	6400 UI
1/6400	7680 UI	10240 UI	12800 UI
1/12800	15360 UI	20480 UI	25600 UI
1/25600	30720 UI	40960 UI	51200 UI

Tomado de: Centro Internacional de Zoonosis (2012). Manual de procedimientos para la composición y preparación de los medios y reactivos para la bacterioscopía, aislamiento, identificación y biotipificación de *Brucella* a partir de muestras biológicas. Quito, Ecuador.

3. Inmunoensayo Cromatográfico: Se utiliza una placa de nitrocelulosa (zona de detección) que contiene LPS específico de *Brucella abortus* como antígeno, una almohadilla absorbente y una almohadilla control que contiene un conjugado de anticuerpos purificados (IgG) y partículas de oro coloidales en un dispositivo plástico. En la zona de detección se desplegará una línea control y una línea de prueba. La línea de prueba se obtiene depositando una gota del suero de prueba en la almohadilla de aplicación seguida del diluyente proporcionado, compuesto de solución salina tamponada estéril (pH 7.6) y albúmina sérica bovina (Bronsvoort *et al*, 2009). La prueba se considera negativa cuando no se presenta la línea de prueba y positiva si la línea se presenta. La línea de control debe teñirse en todos los casos. (Abdoel *et al*, 2008; Araj, 2010).



Técnica descrita por el fabricante (BioNote Inc.):

- Colectar una muestra de 3-4ml de sangre venosa.
- Dejar reposar hasta la formación del coágulo.
- Centrifugar la muestra para obtener el suero.
- Utilizando el tubo capilar proporcionado por el fabricante, colectar una gota de suero (20 μ L) y depositarla en la almohadilla absorbente de la placa.

- Depositar 3 gotas del diluyente en la almohadilla absorbente de la placa.
- Si no ha ocurrido migración dentro de los 2 primeros minutos, colocar 1 gota más del diluyente.
- Esperar 20 minutos para la lectura de los resultados, este tiempo no deberá prolongarse. La lectura deberá hacerse a temperatura ambiente, 15-30°C.

Interpretación de los resultados:

Negativo (-): Solamente existe una línea de color púrpura en la zona de detección.



Positivo (+): Existe la presencia de dos líneas de color púrpura en la zona de detección.



Inválido: Si no existe ninguna línea de color púrpura en la zona de detección, se recomienda reevaluar.



Sueros:

Se utilizaron 58 sueros de animales no vacunados, confirmados positivos o negativos (de referencia) mediante pruebas serológicas SAT, RB, ELISA, BPA y CFT pertenecientes al CIZ para la validación de la prueba AB-test. Para la prueba en campo se seleccionaron 80 sueros provenientes de la Encuesta Nacional de Brucelosis y Tuberculosis bovina, igualmente realizada por el CIZ, de animales tanto vacunados como no vacunados, de manera aleatoria simple, en la que adicionalmente se realizaron las pruebas SAT y RB. Estas muestras se encontraban congeladas, por lo que se procedió primero a colocarlas en refrigeración por 24 horas y posteriormente se las dejó reposar a temperatura

ambiente por 30 minutos antes de realizar cualquier procedimiento. De igual manera, antes de utilizar los sueros, se los homogenizó en un Vórtex por 5 segundos.

3.4 Diseño Experimental

El estudio de tipo experimental consistente en la validación preliminar de la prueba inmunocromatográfica AB-test, mediante la utilización de 58 sueros bovinos de referencia, confirmados positivos o negativos por medio de las pruebas RB, SAT, BPA, ELISA y FC y su posterior evaluación en 80 sueros bovinos procedentes del banco de sueros de la Encuesta Nacional de Brucelosis y Tuberculosis Bovina, todos pertenecientes al CIZ, elegidos al azar de manera aleatoria simple y su confrontación con los resultados obtenidos a las pruebas SAT y RB.

El tamaño de la muestra para la prueba en campo se determinó mediante las fórmulas descritas a continuación, utilizando una precisión del 95%, error del 5% y una prevalencia esperada del 10% (Ron Román J., comunicación personal, 16 de julio, 2012).

$$n = \frac{z^2 \times Pt \times (1 - Pt)}{d^2}$$

n= talla de la muestra

z= error

Pt= prevalencia esperada

d= precisión absoluta deseada

Se realizó el muestreo de manera aleatoria simple tanto para elegir los sueros de referencia como para elegir las muestras provenientes de la Encuesta Nacional de Tuberculosis y Brucelosis bovina.

Los datos fueron analizados utilizando la prueba de χ^2 para determinar la existencia de diferencias entre las distintas pruebas realizadas por el CIZ y AB-test, a través del coeficiente de correlación *kappa* para determinar la concordancia entre las pruebas diagnósticas AB-test, RB y SAT. Los resultados se organizaron en grupos de acuerdo al tipo de prueba realizado y al resultado obtenido.

$$\chi^2 = \frac{(\text{Observados} - \text{Esperados})^2}{\text{Esperados}}$$

$$Kappa = \frac{(\% \text{ de acuerdo observado} - \% \text{ de acuerdo esperados sólo por azar})}{100\% - \text{porcentaje de acuerdo esperados sólo por azar}}$$

Para la determinación del VPN y VPP de la prueba AB-test se utilizó la siguiente metodología:

Tabla 6. Metodología para la determinación del VPP Y VPN

		Enfermedad		
		Enfermos	Sanos	Total
Prueba Dx	Positivos	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)	VP+FP
	Negativos	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)	FN+VN
Total		VP+FN	FP+VN	

$$VPN = \frac{VN}{(FN + VN)}$$

$$Ss = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$VPP = \frac{VP}{(VP + FP)}$$

$$Sp = \frac{VN}{FP + VN}$$

Capítulo IV

4.1 Resultados y Discusión

4.1.1 Sueros de Referencia

Tabla 7. Resultados de las pruebas realizadas en los sueros de referencia.

RB	AB-					Total
	BPA	SAT	ELISA	CFT	TEST	
-	-	-	-	-	-	42
-	-	-	+	-	-	1
-	-	+	-	-	-	2
-	+	-	+	-	-	1
-	+	+	+	-	-	3
-	+	+	+	+	-	1
+	+	+	+	+	-	2
+	+	+	+	+	+	6
TOTAL						58

4.1.2 Sueros provenientes de Encuesta

Tabla 8. Resultados de las pruebas realizadas en los sueros provenientes de la Encuesta

RB	AB-		Total
	SAT	TEST	
-	-	-	72
+	+	-	7
+	+	+	1
TOTAL			80

El hecho de que los sueros utilizados se encontraban congelados y se requirió su descongelación, ambientación y homogenización antes de realizar las pruebas, no representa un problema importante debido a que aunque existe cierta destrucción de anticuerpos, ésta no es significativa y no altera en mayor medida el nivel de anticuerpos contenidos en los sueros originalmente (Bronsvort *et al*, 2009). Este hecho se corroboró mediante la repetición de las pruebas SAT y RB en los sueros de referencia.

4.2 Prueba Chi²

Tabla 9. Chi² para RB y AB-TEST

Observado				
		RB		
AB-TEST	pos	neg	total	
pos	7	1	8	
neg	9	121	130	
Total	16	122	138	

Esperado			
		RB	
AB-TEST	pos	neg	
pos	0.93	7.07	
neg	15.07	114.93	

Chi ²			
		RB	
		pos	neg
AB-TEST	39.76		
pos	2.45	5.21	
neg		0.32	
47.74			

chi parcial

Existe diferencia muy significativa.

Tabla 10. Chi² para BPA y AB-TEST

Observado				
		BPA		
AB-TEST		pos	neg	Total
pos		7	0	7
neg		6	45	51
Total		13	45	58

Esperado			
		BPA	
AB-TEST		pos	neg
pos		1.57	5.43
neg		11.43	39.57

chi ²			
		BPA	
AB-TEST		pos	neg
pos		18.80	5.43
neg		2.58	0.75
chi parcial		27.56	

Existe diferencia muy significativa.

Tabla 11. Chi² para SAT y AB-TEST

Observado			
SAT			
AB-TEST	pos	neg	total
pos	8	0	8
neg	14	116	130
Total	22	116	138

Esperado		
SAT		
AB-TEST	pos	neg
pos	1.28	6.72
neg	20.72	109.28

chi ²		
SAT		
AB-TEST	pos	neg
pos	35.46	6.72
neg	2.18	0.41
chi parcial	44.78	

Existe diferencia muy significativa.

Tabla 12. Chi² para ELISA y AB-TEST

Observado			
ELISA			
AB-TEST	pos	neg	Total
pos	7	0	7
neg	7	44	51
Total	14	44	58

Esperado		
ELISA		
AB-TEST	pos	neg
pos	1.69	5.31
neg	12.31	38.69

chi ²		
ELISA		
AB-TEST	pos	neg
pos	16.69	5.31
neg	2.29	0.73
chi parcial	25.02	

Existe diferencia muy significativa.

Tabla 13. Chi² para CFT y AB-TEST

Observado			
CFT			
AB-TEST	pos	neg	Total
pos	7	0	7
neg	3	48	51
Total	10	48	58

Esperado		
CFT		
AB-TEST	pos	neg
pos	1.21	5.79
neg	8.79	42.21

chi ²		
CFT		
AB-TEST	pos	neg
pos	27.81	5.79
neg	3.82	0.80
chi parcial	38.21	

Existe diferencia muy significativa.

La diferencia significativa que existe entre las pruebas realizadas por el CIZ (RB, SAT, ELISA, CFT y BPA) y AB-TEST demuestra que es importante contar con el apoyo de un laboratorio para confirmar los resultados obtenidos con AB-TEST y de esta manera elaborar un diagnóstico adecuado de esta enfermedad.

4.3 Prueba *Kappa*

Tabla 14. Coeficiente *Kappa* para RB y AB-TEST

RB			
AB-TEST	Pos	neg	total
pos	7	1	8
neg	9	121	130
Total	16	122	138

Kappa= 0.55

ES=0.12

IC=0.30-0.80

Grado de asociación moderado

Tabla 15. Coeficiente Kappa para SAT y AB-TEST

AB-TEST	SAT		
	pos	neg	total
pos	8	0	8
neg	14	116	130
Total	22	116	138

Kappa=0.49

ES=0.11

Grado de asociación moderado

IC=0.27-0.7

De acuerdo al coeficiente Kappa, el grado de asociación entre las pruebas SAT y AB-TEST es de 0.49 (moderado); de igual manera sucede entre las pruebas RB y AB-TEST, cuyo valor es de 0.55 (moderado).

Puesto que las pruebas SAT y RB utilizan suspensiones compuestas de células enteras como antígeno, son susceptibles de arrojar resultados falsos positivos por reacciones inespecíficas, mientras que la prueba AB-TEST detecta anticuerpos dirigidos hacia el LPS, se espera que el grado de asociación no sea alto por los principios diferentes que las pruebas manejan.

4.4 Determinación de VPP y VPN

Tabla 16. VPP, VPN, SE y Sp para la prueba AB-Test

AB-TEST	Gold estándar		
	Pos	Neg	Total
Pos	8	0	8
Neg	16	114	130
Total	24	114	138

VPP=	1
VPN=	0.88
SE=	0.33
SP=	1

La prueba inmunocromatográfica AB-TEST demuestra tener un VPP del 100%; es decir que todos los resultados positivos obtenidos pertenecían a animales infestados y un VPN del 88%, que indica que la prueba es susceptible de dar resultados falsos-negativos; este valor puede ser consecuencia de que algunos de los animales incluidos en el estudio hayan presentado un nivel muy bajo de anticuerpos ya sea por infección reciente o anticuerpos residuales procedentes de una vacunación previa, por lo que la prueba no fue capaz de detectarlos (Smits *et al*, 2003; Bronsvort *et al*, 2009). Este hecho representa un potencial problema puesto que es imposible tener certeza acerca de la causa que arroja este tipo de resultados.

También se puede observar que la prueba es altamente específica (100%) lo que concuerda con lo descrito en publicaciones realizadas previamente; sin embargo, en esta investigación se obtuvo una sensibilidad del 33%, valor que difiere significativamente de los obtenidos anteriormente en dichas publicaciones (80-95%) y puede deberse a los problemas ya expuestos (Smits *et al*, 2003; Bronsvort *et al*, 2009).

Capítulo V

5.1 Conclusiones

La prueba AB-TEST motivo de esta investigación no reemplaza a las pruebas que oficialmente se realizan en laboratorio por el número de resultados falso-negativos que se pueden obtener, por lo que es importante respaldarlos mediante la utilización de otros métodos de diagnóstico; sin embargo es una prueba rápida y sencilla de usar.

Por esta razón, para todo estudio epidemiológico, se debe proceder primero con la prueba de aglutinación RB como “screening”, que es económica, rápida, de fácil aplicación y con bajo riesgo para el operador.

Es importante tomar en cuenta que la interpretación de los resultados obtenidos mediante una o más pruebas serológicas debe realizarse de acuerdo al estado epidemiológico del país, de la región y del estado sanitario del hato.

5.2 Recomendaciones

Siendo AB-TEST una prueba no validada ni estandarizada oficialmente, se sugiere que se desarrollen más investigaciones acerca de esta prueba, con un mayor número de animales, para respaldar los resultados obtenidos en la presente investigación.

Con un mayor número de animales testados mediante la prueba sujeta a investigación, se podría establecer comparaciones con los resultados obtenidos mediante la técnica de cELISA que diferencia anticuerpos vacunales de los producidos por la infección.

Referencias

- Abdoel T., Travassos I., Cardoso R., Smits H. (2008). Simple and rapid tests for brucellosis in livestock. *Veterinary Microbiology* 130. 312–319.
- Araj G. (2010). Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 365. 512-517.
- Biberstein E., Chung Y. (1994). Tratado de Microbiología Veterinaria pp(11-40, 283-291). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Bronsvort B., Koterwas B., Land F., Handel I., Tucker J., Morgan K., Tanya V., Abdoel T., Smits H. (2009). Comparison of a flow assay for brucellosis antibodies with the reference cELISA test in West African *Bos indicus*. *Public Library of Science* 4. 1-7.
- Carvalho A., Mol J., Xavier M., Paixao T., Lage A., Santos R. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal* 84. 146-155.
- Centro Internacional de Zoonosis (2012). Manual de procedimientos para la composición y preparación de los medios y reactivos para la bacterioscopía, aislamiento, identificación y biotipificación de *Brucella* a partir de muestras biológicas. Quito, Ecuador.
- Chapel R., Hayes J., Brain G., McNaught D. (1982). A modified radioimmunoassay for antibodies against *Brucella abortus*. *Journal of Higiene* 88. 1-9.
- Corbel M. (1997). First International Conference on Emerging Zoonoses *Emerging Infectious Diseases* 3. 213-221.
- Corbel M. (2006). Brucellosis in Humans and animals (pp 3-12, 28-33). Geneva: World Health Organization.
- Costa S., Souza F., Costa G., de Almeida L., Barbosa N. (2008). *Microbes and Infection* 10. 1005-1009.
- Díaz R., Casanova A., Ariza J., Moriyón I. (2011). The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *Neglected Tropical Diseases* 5. 1-7.
- Fitch T. (2003). Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Veterinary Microbiology* 92. 213-223.

- Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010). Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* 51. 296- 305.
- Matope G., Muma J., Toft N., Gori E., Lund A., Nielsen K., Skjerve E. (2011). Evaluation of sensitivity and specificity of RBT, c-ELISA and fluorescence polarization assay for diagnosis of brucellosis in cattle using latent class analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141. 58-63.
- McGiven J., Tucker J., Perret L., Stack J., Brew S., MacMillan A. (2003). Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and iELISA. *Journal of Immunological Methods* 278. 171-178.
- Merchant I., Packer R. (1980). Bacteriología y Virología Veterinarias. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 90. 447-459.
- Quinn P., Markey B., Leonard F., Fitzpatrick E., Fanning S., Hartigan P. (2002). Veterinary microbiology and microbial disease pp (162-167). Oxford: Blackwell Science
- Rebhun W. (1999). Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero pp(623-625). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Romero R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana pp (911). D.F: Editorial Médica Panamericana.
- Seleem M., Boyle S., Sriranganathan N. (2008). *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Veterinary Microbiology* 129. 1-14.
- Smith B. (2010). Medicina Interna de Grandes Animales pp(1461. Barcelona: Elsevier.
- Smits H., Abdoel T., Solera J., Clavijo E., Díaz R. (2004). Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10. 1141-1146.
- Stanchi N., Martino P., Gentilini E., Reinoso E., Echeverría M., Leardini N., Copes J. (2007). Microbiología Veterinaria pp (281-293). Buenos Aires: Inter-Médica Editorial.

Tizard I. (2002). *Inmunología Veterinaria* pp (22-37). México D.F: McGraw-Hill Interamericana.

Torres H. (2009). *Programa Nacional de control de brucelosis*. Disponible en Internet desde: <http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/index.php/en/animal-health/saspecific-programs>. Acceso: Febrero, 2012.

Universidad Central del Ecuador (2004). *Centro Internacional de Zoonosis*. Disponible en Internet desde:

<http://www.uce.edu.ec/centrosdetalle.php?cencod=233&cennom=Centro%20Internacional%20de%20Zoonosis&cenpad=0>. Acceso: Abril, 2012.

Vadillo S., Píriz S., Mateos E (2002). *Manual de Microbiología Veterinaria* pp (275-293). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

World Organization for Animal Health (2004). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* pp (415-416). Geneva: World Organization for Animal Health.

World Organization for Animal Health (2012). *Sistema Mundial de Información Zoonositaria*. Disponible en Internet desde: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newla. Acceso: Diciembre, 2012.

Anexos

Anexo 1: Sueros CIZ



Anexo 2: Kits AB-TEST



Anexo 3: Materiales



Anexo 4: Materiales



Anexo 5: Método AB-TEST



Anexo 6: Método AB-TEST



Anexo 7: Método AB-TEST



Anexo 8: Método AB-TEST



Anexo 9: Resultados



Anexo 10: Resultado Positivo



Anexo 11: Resultado Negativo



Anexo 12: Laboratorio de Inmunología CIZ



Anexo 13: Registro

Estudio	#	RB	BPA	SAT	SAT UI	ELISA	CFT	AB-TEST	Gold Standard	Sexo	Vacuna	Fecha	Cepa
Encuesta	2684	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2685	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2686	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2687	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2688	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2689	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2690	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2691	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2692	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2693	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2694	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2695	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2696	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2697	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2698	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2699	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2700	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2701	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2702	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2703	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2704	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2705	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2706	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2707	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2708	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2709	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2710	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2711	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2712	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2713	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2714	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2715	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2716	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2717	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2718	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2719	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2720	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2721	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2722	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2723	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Encuesta	2644	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	si	2010	nd
Encuesta	2645	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	si	2010	nd
Encuesta	2646	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	si	2010	nd
Encuesta	2647	Pos	n/a	Pos	30UI	n/a	n/a	Neg	Pos	H	si	2010	nd
Encuesta	2648	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	si	2010	nd
Encuesta	2649	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	si	2010	nd
Encuesta	2650	Neg	n/a	Neg	Neg	n/a	n/a	Neg	Neg	H	si	2010	nd
Encuesta	2651	Pos	n/a	Pos	Neg	n/a	n/a	Neg	Pos	H	si	2010	nd

Referencia	86	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	87	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	88	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	89	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	90	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	104	Pos	Pos	Pos	3200UI	Pos	Pos	Pos	Pos	H	no	n/a	n/a
Referencia	106	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	H	no	n/a	n/a
Referencia	107	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	108	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	109	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	112	Neg	Pos	Pos	50UI	Pos	Pos	Neg	Pos	H	no	n/a	n/a
Referencia	260	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	261	Neg	Pos	Pos	100UI	Pos	Neg	Neg	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	262	Pos	Pos	Pos	3200UI	Pos	Pos	Pos	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	263	Pos	Pos	Pos	80UI	Pos	Pos	Neg	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	264	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	265	Pos	Pos	Pos	800UI	Pos	Pos	Pos	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	266	Pos	Pos	Pos	800UI	Pos	Pos	Pos	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	267	Pos	Pos	Pos	400UI	Pos	Pos	Pos	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	268	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	269	Neg	Pos	Pos	50UI	Pos	Pos	Pos	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	272	Pos	Pos	Pos	800UI	Pos	Pos	Neg	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	273	Pos	Pos	Pos	300UI	Pos	Pos	Pos	Pos	M	no	n/a	n/a
Referencia	274	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	276	Neg	Neg	Pos	75UI	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	277	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	372	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	442	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	443	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	446	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	447	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	448	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	449	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	451	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	452	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	453	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	454	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	M	no	n/a	n/a
Referencia	455	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a
Referencia	456	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	H	no	n/a	n/a