



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (cELISA) PARA
LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA *Brucella* spp. EN EL
GANADO BOVINO”**

JARRÍN PORRAS, ESTEFANY CAROLINA

DIRECTOR: Dr. RON ROMÁN, JORGE WASHINGTON, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2018



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (cELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA Brucella spp. EN EL GANADO BOVINO”* fue realizado por la señorita *Jarrín Porras, Estefany Carolina* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 6 de marzo de 2018

JORGE RON ROMÁN, Ph.D.

C.C 1709505125



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Jarrín Porras, Estefany Carolina*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Optimización del ensayo inmunoenzimático (cELISA) para la detección de anticuerpos IgG contra Brucella spp. en el ganado bovino* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

ESTEFANY CAROLINA JARRÍN PORRAS

C.C. 172326578-9



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Jarrín Porras, Estefany Carolina* autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *Optimización del ensayo inmunoenzimático (cELISA) para la detección de anticuerpos IgG contra Brucella spp. en el ganado bovino* en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 6 de marzo de 2018

ESTEFANY CAROLINA JARRÍN PORRAS

C.C. 172326578-9

DEDICATORIA

“La vida es como un viaje sin meta. Lo que cuenta es el camino.”

Isabel Allende

Dedico este trabajo a mis padres que con mucho esfuerzo y dedicación supieron educarme para convertirme en la mujer que soy. Aún tengo mucho que aprender, pero sé que ustedes siempre estarán ahí para mí.

A mis hermanas cuyas locuras y bromas significan para mí más de lo que ellas piensan. Esas risas, ya sea a mediodía o a medianoche, son el mejor liberador de estrés que he podido encontrar.

Estefany Carolina Jarrín Porras

AGRADECIMIENTOS

Dr. Jorge Ron Román por sus enseñanzas, aportes científicos, tiempo y paciencia brindados durante este proyecto.

Dra. María Augusta Chávez por su colaboración científica y apoyo con las instalaciones y equipos para el procesamiento de las muestras.

Dr. Armando Reyna-Bello por guiar y estar pendiente de este proyecto. Gracias por compartir sus conocimientos en inmunología conmigo.

Prof. Claude Saegerman de la Universidad de Lieja – Bélgica, por facilitarnos los anticuerpos monoclonales.

Al Centro de Estudios e Investigación Veterinaria y Agroquímica (CERVA) en Bélgica por la provisión de los sueros controles.

Al Laboratorio de Sanidad Animal de AGROCALIDAD y al Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador, por facilitarnos sueros controles para las pruebas.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por facilitarnos reactivos y equipos necesarios.

A los dueños de las fincas de la parroquia San Pedro de Suma del cantón El Carmen, provincia de Manabí, así como a las haciendas de Santa Cruz, Galápagos por facilitarnos las muestras sanguíneas.

A las chicas y chicos de Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, por la ayuda y consejos en el desarrollo de las pruebas, así como a la Ing. Cristina Cholota, a Katherine Balarezo y a Michelle Medina por su ayuda en los ensayos de reproducibilidad de la técnica.

A todos, muchas gracias.

Estefany Carolina Jarrín Porras

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	II
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	III
AUTORIZACIÓN.....	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS	4
1.3.1 <i>Objetivo General</i>	4
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	4
CAPÍTULO 2 – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 BRUCELOSIS	5
2.2 AGENTE CAUSAL.....	5
2.2.1 <i>Taxonomía</i>	5
2.2.2 <i>Morfología</i>	6
2.2.2.1 <i>Envoltura celular</i>	7
2.2.2.2 <i>Lipopolisacáridos (LPS)</i>	8
2.2.2.3 <i>Proteínas de la membrana externa (OMP)</i>	9
2.3 PATOGENICIDAD.....	9

2.4	TRANSMISIÓN	10
2.5	RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	12
2.6	SIGNOS CLÍNICOS	14
2.7	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	15
2.7.1	<i>Métodos directos</i>	15
2.7.1.1	Diagnóstico bacteriológico	15
2.7.1.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	15
2.7.2	<i>Métodos indirectos</i>	16
2.7.2.1	Prueba de aglutinación rápida en placa (Rosa de Bengala)	16
2.7.2.2	Prueba de seroaglutinación lenta en tubo o prueba de Wright (SAT).....	17
2.7.2.3	Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA).....	17
2.7.2.4	Ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA).....	17
2.7.2.4.1	Anticuerpos monoclonales	18
2.8	PREVENCIÓN Y CONTROL	19
2.8.1	<i>Tratamiento</i>	19
2.8.2	<i>Control</i>	19
2.8.2.1	Vacunas utilizadas en animales	20
2.9	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	21
2.9.1	<i>Distribución mundial</i>	21
2.9.2	<i>Distribución en Latinoamérica</i>	23
2.9.3	<i>Distribución en Ecuador</i>	25
2.10	LINEAMIENTOS DEL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE BRUCELOSIS BOVINA EN ECUADOR	26
2.10.1	<i>Vacunación terneras</i>	28
2.10.2	<i>Esquema para certificación de predios libres</i>	28
2.11	SISTEMA DE HIPÓTESIS.....	29
CAPÍTULO 3 – MATERIALES Y MÉTODOS.....		30
3.1	FASE DE CAMPO	30
3.1.1	<i>Recolección, procesamiento y conservación de muestras de sangre</i>	30

3.2 FASE DE LABORATORIO	31
3.2.1 Obtención de suero sanguíneo.....	31
3.2.2 Prueba de aglutinación rápida en placa (Rosa de Bengala)	31
3.2.2.1 Interpretación de resultados	31
3.2.3 Prueba de seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA)	32
3.2.3.1 Interpretación de resultados	32
3.2.4 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA).....	33
3.2.5 Ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA).....	34
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
3.3.1 Diseño estadístico	35
3.3.2 Sensibilidad.....	36
3.3.3 Especificidad.....	37
3.3.4 Valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)	37
3.3.5 Repetibilidad.....	37
3.3.6 Reproducibilidad.....	38
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS.....	39
4.1 MUESTRAS SEROLÓGICAS.....	39
4.2 PRUEBA ROSA DE BENGALA (RB)	40
4.3 PRUEBA DE SEROAGLUTINACIÓN LENTA EN TUBO EN PRESENCIA DE EDTA (SAT-EDTA).....	40
4.4 CORRELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE RB Y SAT-EDTA	41
4.5 RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL iELISA	43
4.5.1 Determinación de la solución de bloqueo.....	43
4.5.2 Determinación de la dilución de conjugado G-HRPO	44
4.5.3 Determinación de la concentración óptima de lipopolisacárido (LPS) como	
antígeno y la concentración óptima de la solución de bloqueo	45
4.5.4 Determinación del punto de corte.....	49
4.5.5 Repetibilidad y reproducibilidad del iELISA	50
4.5.6 Resultados del iELISA aplicado a bovinos en tres escenarios epidemiológicos.....	51
4.6 RESULTADOS CELISA	52

4.6.1	<i>Selección del anticuerpo monoclonal</i>	52
4.6.2	<i>Determinación de la dilución óptima del anticuerpo monoclonal frente a diferentes diluciones del conjugado HRP IgG anti-ratón</i>	54
4.6.3	<i>Determinación de la dilución óptima del anticuerpo monoclonal y del conjugado HRP IgG anti-ratón frente a sueros controles</i>	56
4.6.4	<i>Selección de sueros controles y establecimiento del punto de corte</i>	57
4.6.5	<i>Repetibilidad y reproducibilidad del cELISA</i>	61
4.6.6	<i>Resultados del cELISA aplicado a bovinos en tres escenarios epidemiológicos</i>	62
4.7	COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE iELISA Y cELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA	63
4.8	COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE RB, SAT-EDTA, iELISA Y cELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA.....	64
CAPÍTULO 5 – DISCUSIÓN		66
5.1	PRUEBA ROSA DE BENGALA (RB) Y PRUEBA DE SEROAGLUTINACIÓN LENTA EN TUBO EN PRESENCIA DE EDTA (SAT-EDTA).....	66
5.2	DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA POR ELISA INDIRECTO Y SELECCIÓN DE	68
	CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS	68
5.3	OPTIMIZACIÓN DE LA PRUEBA ELISA COMPETITIVO	69
5.4	DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA POR ELISA COMPETITIVO Y COMPARACIÓN CON	73
	LAS OTRAS TÉCNICAS	73
CAPÍTULO 6 – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		77
6.1	CONCLUSIONES.....	77
6.2	RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS		79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la membrana externa de <i>Brucella</i> spp. El LPS que presenta las tres partes se la conoce como LPS lisa (LPS-S), mientras que el LPS que no presenta la cadena O se conoce como LPS rugosa (LPS-R).	8
Figura 2. Modo de transmisión de la brucelosis bovina (<i>Brucella abortus</i>).	11
Figura 3. Cinética de respuesta inmune inducida junto con las diferentes pruebas realizadas después de la infección con <i>Brucella abortus</i> en bovinos. IgG: Inmunoglobulina G; IgM: Inmunoglobulina M; SAT: Seroaglutinación lenta en tubo; ELISA: Ensayo inmunoenzimático; Cut-off: Punto de corte.	13
Figura 4. Representación de los isotipos y estructura de las inmunoglobulinas.	14
Figura 5. Distribución a nivel mundial de la enfermedad de brucelosis.	22
Figura 6. Distribución mundial de brucelosis en ganado según el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (CABI)	23
Figura 7. Distribución de la brucelosis en los países latinoamericanos.	25
Figura 8. Regiones epidemiológicas de brucelosis bovina en Ecuador.....	26
Figura 9. Certificación de Predios Libres.	29
Figura 10. Densidad óptica del ELISA de 5 sueros tratados con diferentes soluciones de bloqueo al 5%. CH: Colágeno Hidrolizado. LS: Leche de Soya.	44
Figura 11. Densidades ópticas (OD) de cinco sueros diluidos 1/50 enfrentados a cuatro diluciones de conjugado G-HRPO (1/25000, 1/37500, 1/50000, 1/62500).	45
Figura 12. Densidades ópticas del ELISA de dos sueros positivos y uno negativo diluidos 1/50, enfrentados a cinco concentraciones del antígeno LPS y tres concentraciones de colágeno hidrolizado. A: Antígeno 1/10, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. B: Antígeno 1/25, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. C: Antígeno 1/50, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. D: Antígeno 1/75, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. E: Antígeno 1/100, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos	

1/50.....	47
Figura 13. Seroprevalencia de brucelosis bovina en muestras procedentes del cantón El Carmen (Manabí), la Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD	52
Figura 14. Diluciones de los anticuerpos monoclonales A: 7F9 y B: 12B12, enfrentados a Una concentración del antígeno LPS de (1 µg/mL).....	53
Figura 15. Diluciones del anticuerpo monoclonal 12B12 enfrentados a una concentración del antígeno LPS (1 µg/mL)	54
Figura 16. Diluciones del anticuerpo monoclonal 7F9, enfrentados a dos sueros positivos y tres sueros negativos diluidos (1/50).....	55
Figura 17. Densidades ópticas (OD) de ocho diluciones de cada anticuerpo monoclonal: 7F9 y 12B12 (1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2580, 1/5120) frente a tres diluciones de conjugado HRP anti-ratón (puro, 1/2, 1/4). HRP: Horseradish peroxidase.	56
Figura 18. Gráfica de las densidades ópticas del ELISA enfrentando un suero control negativo y un suero control positivo con ocho diluciones seriadas de los anticuerpos monoclonales (7F9, 12B12) y tres diluciones de conjugado. Conjugado HRP Puro con A: Anticuerpo monoclonal 7F9 y B: Anticuerpo monoclonal 12B12. Conjugado HRP 1/2 con C: Anticuerpo monoclonal 7F9 y D: Anticuerpo monoclonal 12B12. Conjugado HRP 1/4 con E: Anticuerpo monoclonal 7F9 y F: Anticuerpo monoclonal 12B12.....	58
Figura 19. Establecimiento del punto de corte mediante curvas ROC, usando el paquete de código abierto pROC para R.	61
Figura 20. Seroprevalencia de brucelosis bovina en muestras procedentes del cantón El Carmen (Manabí), la Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD, con la técnica del ELISA competitivo.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Características bioquímicas, hospederos conocidos y biovariedades de las seis especies más conocidas del género Brucella</i>	7
Tabla 2 <i>Condiciones para la supervivencia de Brucella en el medio ambiente</i>	12
Tabla 3 <i>Cepa, derivación, inmunogenicidad y desventajas de las vacunas utilizadas en animales.....</i>	21
Tabla 4 <i>Distribución geográfica, características epidemiológicas, huésped habitual y biovariedades de las especies de Brucella</i>	22
Tabla 5 <i>Distribución de la brucelosis a nivel de Latinoamérica.</i>	24
Tabla 6 <i>Relación entre el grado de translucidez, dilución del suero a investigar y Unidades Internacionales según diluciones del suero control positivo</i>	33
Tabla 7 <i>Estimación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos calculadas a partir de resultados de muestras procedentes de una población que se conoce que están enfermos o sanos.....</i>	36
Tabla 8 <i>Resultados de la prueba Rosa de Bengala aplicada a los sueros recolectados de tres escenarios diferentes</i>	40
Tabla 9 <i>Resultados de la prueba SAT-EDTA aplicada a los sueros recolectados de tres escenarios diferentes</i>	41
Tabla 10 <i>Resultados de la prueba SAT-EDTA titulación expresados en Unidades Internacionales de las muestras consideradas positivas.</i>	42
Tabla 11 <i>Correlación de los resultados de las pruebas RB y SAT-EDTA aplicadas en las muestras del cantón El Carmen.....</i>	42
Tabla 12 <i>Correlación de los resultados de las pruebas RB y SAT-EDTA aplicadas en las muestras de AGROCALIDAD.....</i>	43
Tabla 13 <i>Condiciones óptimas del ELISA indirecto para el diagnóstico de brucelosis bovina ..</i>	48
Tabla 14 <i>Relación entre las diluciones de la curva de calibración y las Unidades (U)</i>	49
Tabla 15 <i>Densidades ópticas, unidades y resultado de las muestras analizadas con el iELISA.</i>	50

Tabla 16 <i>Seroprevalencia de Brucella spp., mediante la prueba ELISA indirecto en bovinos procedentes del cantón El Carmen (Manabí), Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD</i>	51
Tabla 17 <i>Condiciones óptimas del ELISA competitivo para el diagnóstico de brucelosis bovina</i>	59
Tabla 18 <i>Comparación de los resultados de las muestras analizadas por tres pruebas diagnósticas diferentes: Rosa de Bengala, Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA, y ELISA indirecto</i>	60
Tabla 19 <i>Seroprevalencia de Brucella spp., mediante la prueba ELISA competitivo en bovinos procedentes del cantón El Carmen (Manabí), Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD</i>	63
Tabla 20 <i>Comparación de los resultados obtenidos por las pruebas ELISA indirecto y ELISA competitivo, aplicadas a las muestras de tres escenarios epidemiológicos para el diagnóstico de brucelosis bovina</i>	63
Tabla 21 <i>Comparación de los resultados obtenidos por las pruebas Rosa de Bengala, Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA, ELISA indirecto y ELISA competitivo, aplicadas a las muestras de tres escenarios epidemiológicos para el diagnóstico de brucelosis bovina</i>	64
Tabla 22 <i>Resultados de las pruebas diagnósticas para brucelosis en muestras de tres escenarios epidemiológicos diferentes</i>	65

RESUMEN

Brucella abortus es una bacteria Gram negativa del género *Brucella* que afecta a diferentes especies animales así como a humanos, considerada como el agente infeccioso principal de la brucelosis bovina. El control de la enfermedad en Ecuador se basa en el sacrificio de los animales enfermos y la vacunación. El uso de la vacuna Cepa 19 presenta un reto en el diagnóstico por la presencia de falsos positivos, impidiendo una discriminación adecuada entre animales sanos vacunados y enfermos, generando pérdidas económicas importantes en la industria pecuaria. El presente trabajo de investigación busca la optimización del ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) como una alternativa confiable para el diagnóstico de brucelosis en el ganado bovino, discriminando los falsos positivos y facilitando el control de la enfermedad. Las muestras de suero bovino del estudio fueron obtenidas de otras investigaciones realizados en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas–ESPE, recolectando un total de 141 muestras procedentes de la parroquia San Pedro de Suma (El Carmen, Manabí) y la Isla Santa Cruz (Galápagos), además de 25 muestras de suero bovino procedentes de AGROCALIDAD. La prueba cELISA se optimizó a una concentración de antígeno lipopolisacárido (LPS) de 1 µg/mL, dilución de suero 1/50, dilución del anticuerpo monoclonal 7F9 1/320, conjugado HRP IgG anti-ratón (Kit comercial) 1/2; con un punto de corte de 26.88% de inhibición. La aplicación de la prueba cELISA determinó la prevalencia aparente de 42.86%, 1.18% y 16% para las muestras del cantón El Carmen, Isla Santa Cruz y AGROCALIDAD, respectivamente. La validación de la prueba estableció una sensibilidad y especificidad del 83.33%, coeficiente de variación del 10.67% y coeficiente de correlación intra-clase del 83.62% (Kappa=0.727, $p < 0.05$). Los resultados obtenidos indican la necesidad de mejorar las técnicas de diagnóstico para el control y prevención de la brucelosis en el país.

PALABRAS CLAVES:

- **BRUCELOSIS**
- *Brucella* spp.
- **ELISA COMPETITIVO**
- **ELISA INDIRECTO**
- **ANTICUERPO MONOCLONAL 7F9**

ABSTRACT

Brucella abortus is a Gram-negative bacterium of the genus *Brucella* that affects different animal species as well as humans, considered as the main infectious agent of bovine brucellosis. The control of the disease in Ecuador is based on the sacrifice of sick animals and vaccination. The use of the Strain 19 vaccine presents a diagnostic challenge due to the presence of false positives, preventing adequate discrimination between healthy vaccinated and sick animals, generating significant economic losses in the livestock industry. The aim of this research was the optimization of the competitive immunoenzymatic assay (cELISA) as a reliable alternative for the diagnosis of brucellosis in cattle, discriminating false positives and helping the control of the disease. The bovine serum samples from the study were obtained from other research projects carried out in the Animal Biotechnology Laboratory of Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, collecting a total of 141 samples from San Pedro de Suma (El Carmen, Manabí), and Santa Cruz Island (Galápagos). In addition, 25 samples of bovine serum from AGROCALIDAD were obtained. The cELISA test was optimized at a concentration of lipopolysaccharide antigen (LPS) of 1 µg/mL, dilution of serum 1/50, dilution of monoclonal antibody 7F9 1/320, HRP conjugate goat anti-mouse IgG (commercial kit) 1/2; with a cutoff point of 26.88% of inhibition. The application of the cELISA test determined the apparent prevalence of 42.86%, 1.18% and 16% for the samples from El Carmen, Santa Cruz Island and AGROCALIDAD, respectively. The validation of the test established a sensitivity and specificity of 83.33%, a coefficient of variation of 10.67% and an intra-class correlation coefficient of 83.62% (Kappa=0.727, p<0.05). The results obtained indicate the need to improve the diagnostic techniques for the control and prevention of brucellosis in the country.

KEYWORDS:

- **BRUCELLOSIS**
- *Brucella* spp.
- **COMPETITIVE ELISA**
- **INDIRECT ELISA**
- **MONOCLONAL ANTIBODY 7F9**

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

La brucelosis es una enfermedad zoonótica producida por bacterias Gram negativas del género *Brucella* spp., que se encuentran distribuidas por todo el mundo. La primera mención sobre esta enfermedad se remonta a la época de Hipócrates (450 a.C.), pero es a partir de 1751 que Cleghorn realiza las primeras descripciones de la enfermedad (Díaz, Hernández, Valero, & Arellano, 2000).

En el período de la guerra de Crimea (1854-1856), se observó una enfermedad de fiebres prolongadas que se extendió por los países del Mar Mediterráneo. En el año 1859, Marston realizó estudios clínicos de la enfermedad en la Isla de Malta junto con las autopsias de las personas que presentaban los síntomas, logrando describir la enfermedad según aparecía en el lugar. A esta enfermedad se la llamó fiebre de Malta, fiebre Mediterránea o fiebre ondulante (Padrón, Martínez, Peniche, & López, 2011).

El agente causal de la enfermedad en humanos no fue identificado sino hasta el año de 1886 cuando David Bruce logró aislar la bacteria en agar nutriente a partir del bazo de un soldado británico muerto, denominándola inicialmente como *Micrococcus melitensis* (Rodríguez et al., 2001). Bruce comprobó el origen de la enfermedad logrando reproducir los síntomas al infectar a monos con la bacteria (Díaz et al., 2000).

En el caso del ganado bovino, la enfermedad era conocida desde mediados del siglo XVIII, pero fue en 1895 que en Dinamarca, Bang y Stribolt realizaron la descripción de la enfermedad, colocando al aborto como el principal signo visible. También establecieron que el agente infeccioso se transmitía a través de la leche y el toro, el cual lograron identificar como *Micrococcus abortus* o bacilo de Bang. Actualmente, la bacteria se conoce como *Brucella abortus* (Díaz et al., 2000; Padrón et al., 2011).

El primer método de diagnóstico que se desarrolló para la brucelosis fue realizado por Wright y Semple en 1897. Mediante el conocimiento de que el suero sanguíneo de las personas

con la enfermedad se aglutinaba, elaboraron una prueba de seroaglutinación en tubos (Rodríguez et al., 2001), y es a partir de aquí que se reportaron más casos sobre la presencia de la enfermedad tanto en animales como en humanos, permitiendo un mejor estudio de los factores de transmisión (Padrón et al., 2011), y demostración de la relación entre el bacilo de Bang con *Micrococcus melitensis* por Alice Evans en 1917.

La enfermedad llegó a América junto con los conquistadores y al traslado de ganado infectado, específicamente ganado caprino, al nuevo continente. Los primeros casos de brucelosis en humanos dentro de América Latina fue observado en Perú en el año de 1912; posteriormente Morales Otero en 1922 reporta casos de aborto en el ganado bovino (Padrón et al., 2011). En Ecuador, el primer reporte de brucelosis fue realizado por Salvestroni en el año de 1955 (Paredes, 2012), sin embargo AGROCALIDAD (2016b) menciona que Salvestroni evidenció la presencia de brucelosis en el año de 1926.

En el año de 1979, se determinó la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino de las provincias de la Sierra y Costa ecuatorianas por medio del Programa Nacional de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. El estudio se llevó a cabo en 15.393 bovinos de diferentes provincias y con la prueba serológica en placa se detectaron 495 casos positivos para brucelosis (AGROCALIDAD, 2009).

Brucella spp. se presenta como un importante agente infeccioso en muchos países debido a la enfermedad crónica que produce en el ganado bovino (especialmente *Brucella abortus*), afectando a animales de diferentes edades, desde terneros hasta bovinos sexualmente adultos (AGROCALIDAD, 2016b). La brucelosis produce grandes pérdidas económicas en el sector pecuario, llegando a valores de hasta 5.5 millones de dólares por año (Torres, 2008); además de ser una de las principales zoonosis a nivel mundial, cuyo tratamiento genera una merma tanto por la disminución de mano de obra como por la atención médica que requieren las personas infectadas.

La optimización del ensayo inmunoenzimático competitivo para el diagnóstico de brucelosis permitirá la detección efectiva de la enfermedad, así como la prevención oportuna tanto en los animales como en las personas más vulnerables a contraer la infección. El presente trabajo favorecerá al sector pecuario y a la salud pública al brindar una prueba para la detección

de anticuerpos contra *Brucella* spp., con una fácil interpretación de los resultados para un mejor control de la enfermedad.

1.2 Justificación

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Brucella* spp., cuyo reservorio natural se encuentra en animales domésticos como ovejas, cabras, cerdos y bovinos. La transmisión de la enfermedad ocurre por contacto directo con la placenta durante el parto o los productos del aborto; pero el consumo de productos no pasteurizados como la leche o quesos también pueden transmitir la enfermedad a la población (OIE, 2016a).

En Ecuador, el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) realizó una encuesta agropecuaria donde se reporta que hasta el año 2011 existieron 5'358.904 cabezas de ganado vacuno, de los cuales el mayor porcentaje se encontró distribuido en la región Sierra (2'583.353, 50.99%); además del total del ganado, las vacas ordeñadas correspondieron al 21,04% (1'127.363) junto con una producción de leche de 6'375.323 litros (INEC, 2011). Por tal razón para evitar tanto el contagio de la enfermedad a la población como las pérdidas económicas por el sacrificio de los animales enfermos y por la disminución en la producción de leche, que hasta el año 2000 se estimó una pérdida total anual de 5'436.908 de dólares (AGROCALIDAD, 2009), se recomienda una vigilancia mediante técnicas diagnósticas como las pruebas serológicas y análisis de leche, junto con programas de vacunación y la pasteurización (OIE, 2010).

Los métodos diagnósticos para la brucelosis en animales pueden ser directos como el aislamiento de la bacteria mediante cultivo a partir de un tejido o secreción, o indirectos como son las pruebas serológicas o de hipersensibilidad. De estas pruebas, las que comúnmente se emplean para el diagnóstico son Rosa de Bengala en plato (RBT), seroaglutinación de Wright (SAT), prueba del anillo en leche (MRT), fijación de complemento (CFT), ELISA indirecto o competitivo, y el ensayo de polarización de fluorescencia (Wang et al., 2015). El problema que presenta la mayoría de estas pruebas son los falsos positivos que resultan de una reacción cruzada debido a la estructura similar que posee el LPS (Lipopolisacárido) de *Brucella* spp. con respecto a los LPS de otras bacterias Gram negativas, siendo el caso de *Escherichia coli* O:157 (Fretin, 2013), o *Yersinia enterocolitica* O:9 que causó falsos positivos durante la prueba ELISA

(Weynants et al., 1996). Además, la vacunación de animales sanos también presenta una interferencia durante la interpretación de los resultados por lo que se debe tener en cuenta esta información antes de diagnosticar la enfermedad (World Health Organization, 2006).

La sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas difieren entre sí, al igual que su implementación, costo y manejo (Peeridogaheh, Golmohammadi, & Pourfarzi, 2013; Wang et al., 2015). Es por esos que cada vez se busca desarrollar pruebas rápidas y que sean capaces de evitar los falsos positivos, es decir el de diferenciar entre los animales vacunados de animales infectados, siendo el ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) un ejemplo (Díaz et al., 2000).

El presente trabajo de investigación busca la optimización del ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) como una alternativa confiable para el diagnóstico de brucelosis en el ganado bovino, discriminando los falsos positivos y facilitando el control de la enfermedad.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Optimizar el ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) para la detección de anticuerpos IgG contra *Brucella* spp. en el ganado bovino.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar las diluciones apropiadas de antígeno, suero y anticuerpos monoclonales para el ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA).
- Determinar el punto de corte (“cut-off”) del ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) empleando sueros controles positivos y negativos.
- Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y repetibilidad del ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA).
- Comparar los resultados del ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) previamente optimizado, con los resultados obtenidos con el ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA).

CAPÍTULO 2 – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Brucelosis

Brucelosis es el nombre que recibe la enfermedad infecto-contagiosa causada por un grupo de bacterias Gram negativas del género *Brucella* que afecta a los animales y las personas, siendo la principal enfermedad zoonótica a nivel mundial (Díaz et al., 2001; World Health Organization, 2006), y que además produce importantes pérdidas económicas. La mayor incidencia de casos de brucelosis se localiza en Oriente Medio, África subsahariana, China, región del Mediterráneo, India, Perú y México (OIE, 2010).

El nombre de la enfermedad ha ido cambiando desde su primera observación, presentado diferentes nombres que provienen de la similitud de sus síntomas con la fiebre tifoidea y malaria, así como de su duración o su prevalencia en una determinada región (Madkour, 2014). Entre algunos sinónimos se encuentran fiebre del Mediterráneo, fiebre de Malta, septicemia de Bruce, fiebre ondulante, enfermedad de Bang, aborto contagioso y aborto infeccioso (Díaz et al., 2000; Ron-Román, 2003).

La brucelosis afecta a diferentes animales como a los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, camélidos y perros, junto con algunos mamíferos marinos (OIE, 2010). Entre las principales especies patogénicas se encuentran *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis* (J Godfroid, 2002; López-Goñi & Moriyón, 2004).

Todas las especies de *Brucella* tienen preferencia por una especie animal, pero pueden ocurrir casos donde infectan a otros huéspedes debido al contacto con la bacteria (OIE, 2010). De manera general, la brucelosis provoca infecciones crónicas en animales de todas las edades, pero persiste en animales que han alcanzado la madurez sexual (AGROCALIDAD, 2016b). Los signos clínicos que comúnmente se observan en los animales son los abortos o pérdida de fertilidad, y en machos se observan alteraciones testiculares (Blasco, 2001).

2.2 Agente causal

2.2.1 Taxonomía

El género *Brucella* se encuentra dentro de la familia Brucellaceae, del orden Rhizobiales, clase 2 de Alphaproteobacteria, filo Proteobacteria. Según el análisis de las secuencias del gen

16S ARNr, los organismos que pertenecen al género *Brucella* se encuentran relacionados filogenéticamente con otros organismos que son patógenos en mamíferos como los géneros *Bartonella*, *Rickettsia* y *Ehrlichia* (Ficht, 2010). También se encuentra relacionadas con patógenos y simbiontes de plantas como *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Moreno, Cloeckert, & Moriyón, 2002).

Se reconocen 6 especies dentro del género *Brucella*, las cuales se dividen en 15 biovariedades y que se diferencian según su huésped o su bioquímica: *Brucella melitensis* con 3 biovariedades que infecta caprinos, *Brucella abortus* con 7 biovariedades que infecta bovinos, *Brucella suis* con 5 biovariedades que infecta porcinos, *Brucella neotomae* que infecta ratas del desierto, *Brucella ovis* que infecta ovinos, y *Brucella canis* que infecta caninos (Diaz et al., 2001).

Algunas cepas de *Brucella* se han identificado en especies marinas como defines, marsopas y focas, por lo que se creó una nueva especie: *Brucella maris* (Diaz et al., 2001). Estudios posteriores sobre estas nuevas cepas de *Brucella* propusieron la correcta posición en la taxonomía del género, creando dos nuevas especies: *Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis* (OIE, 2016b). También se ha identificado una nueva especie encontrada en el suelo del nicho que comparten con los tres géneros de la familia Brucellaceae y que recibe el nombre de *Brucella microti* (Ficht, 2010).

2.2.2 Morfología

El género *Brucella* se caracteriza por ser un grupo de bacterias que se presentan como bacilos pequeños, Gram negativos, sin apéndices móviles y aerobios estrictos. Las bacterias de este grupo no poseen cápsula ni esporulan y su metabolismo es oxidativo, además de que tienen reacción positiva a la prueba de catalasa y oxidasa (Castro, González, & Prat, 2005).

El tamaño de los bacilos oscila entre 0.5-0.7 μm de ancho y 0.6-1.5 μm de largo, y generalmente no presentan resistencia a los ácidos. Algunas cepas de *Brucella* spp. requieren de una cantidad de CO_2 (5-10%) para su crecimiento (M. Corbel & Morgan, 1982). Estas bacterias tienen preferencia por los órganos reproductores (Gómez, 2016). En la Tabla 1 se describen las características bioquímicas de las seis especies más conocidas del género *Brucella*, junto con los hospederos conocidos y sus biovariedades.

Tabla 1

Características bioquímicas, hospederos conocidos y biovariedades de las seis especies más conocidas del género Brucella

Especie	Hospedador	Biovar	Producción de H ₂ S	Necesidad de CO ₂	Sensibilidad a los colorantes	
					Tionina	Fucsina
<i>B. melitensis</i>	Cabras, bovinos, ovino, cánidos, hombre	1	-	-	+	+
		2	-	-	+	+
		3	-	-	+	+
<i>B. abortus</i>	Bovinos, cánidos, hombre	1	+	+	-	+
		2	+	+	-	-
		3	+	+	+	+
		4	+	+	-	+
		5	-	-	+	+
		6	-	-	+	+
		7	+	-	+	+
		8	-	+	+	+
		9	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	Cerdos, cánidos, hombre	1	-	-	+	-
		2	-	-	+	-
		3	-	-	+	+
		4	-	-	+	-
		5	-	-	+	-
<i>B. canis</i>	Cánidos, hombre		-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	Roedores		+	-	-	-
<i>B. ovis</i>	Ovinos		-	+	+	-

Biovar: Biovariedad; **H₂S:** Ácido sulfhídrico; **CO₂:** Dióxido de carbono; **+:** Positivo; **-:** Negativo.

Fuente: Castro et al. (2005).

2.2.2.1 Envoltura celular

La envoltura celular de *Brucella* está formada por fosfolípidos como fosfatidilcolina y lípidos de ornitina. El componente que se encuentra más abundante es el Lipopolisacárido (LPS) o endotoxina, el cual está formado por una parte glucolipídica (lípidos A) que no se encuentra expuesta a la superficie, otra parte formada por oligosacáridos conocida como núcleo, y la parte expuesta en la superficie está formada por un polisacárido O (cadena O). Dentro de las especies de *Brucella*, *B. ovis* y *B. canis* carecen de la cadena O; mientras que *B. melitensis*, *B. abortus*, *B.*

suis, *B. neotomae* la poseen. El LPS que contiene la cadena O se conoce como LPS lisa (LPS-S), tal como se muestra en la *Figura 1*. El LPS rugoso o LPS-R no presenta la cadena O (Castro et al., 2005; Rodríguez et al., 2001).

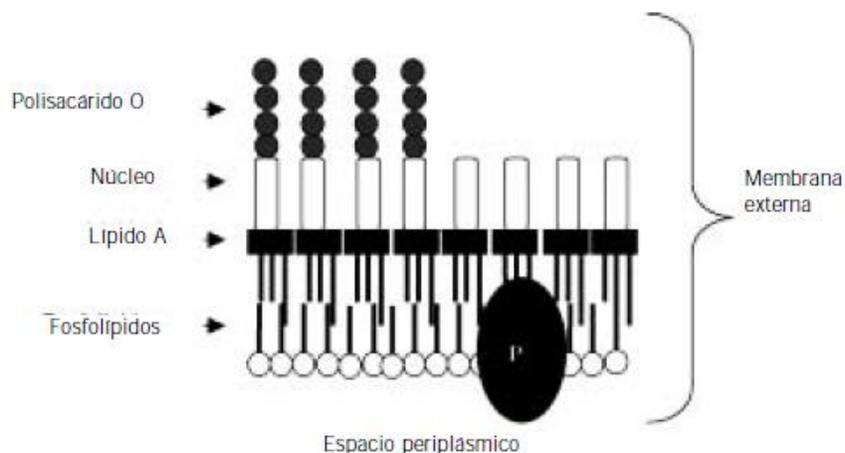


Figura 1. Esquema de la membrana externa de *Brucella* spp. El LPS que presenta las tres partes se la conoce como LPS lisa (LPS-S), mientras que el LPS que no presenta la cadena O se la conoce como LPS rugosa (LPS-R).

Fuente: Castro et al. (2005).

La ausencia de la cadena O, ya sea de manera natural o por mutaciones, permite diferenciar entre las especies de *Brucella*. Las especies que son patógenas para el ser humano presentan un LPS-S, como es el caso de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, además de ser un marcador dominante inmunológico en la respuesta serológica (Rodríguez et al., 2001).

2.2.2.2 Lipopolisacáridos (LPS)

La cadena O presente en los Lipopolisacáridos de fase lisa (LPS-S) posee el determinante antigénico importante para el diagnóstico serológico, es decir, presenta los epitopos que son reconocidos por los anticuerpos (Rodríguez et al., 2001). El problema que se presenta durante el diagnóstico son las reacciones cruzadas por la presencia de otros organismos como *Yersenia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y *Salmonella* del grupo N [O:30]. Estos organismos presentan derivados de perosamina en la estructura de su LPS por lo que son detectados por los anticuerpos durante las pruebas serológicas (Mantur, Amarnath, & Shinde, 2007; Rodríguez et al., 2001).

2.2.2.3 Proteínas de la membrana externa (OMP)

Según Rodríguez et al. (2001), las proteínas de la membrana externa fueron clasificadas de acuerdo a sus características en tres grupos:

- **Grupo 1 (88-94K):** relacionadas con funciones de biosíntesis de la envoltura.
- **Grupo 2 (36-38K):** proteínas que permiten el paso de algunos solutos, las cuales son codificadas por los genes *omp2a* y *omp2b*.
- **Grupo 3 (25-31K):** proteínas codificadas por los genes *omp25* y *omp31*, que interactúan con los LPS.

2.3 Patogenicidad

El proceso de infección por *Brucella* spp. se puede resumir en tres pasos. El primero ocurre durante los 2 primeros días de la infección en donde la bacteria ingresa al huésped. El segundo paso, entre la 2da a la 3ra semana, corresponde a la fase aguda donde la bacteria se replica en las células del bazo, hígado y ganglios linfáticos, así como en los órganos del sistema reproductor. El paso final, entre 6 meses a 1 año o más, corresponde a la fase crónica de la infección donde se presenta patología en los órganos (Martirosyan & Gorvel, 2013).

La principal vía de entrada de *Brucella* en el huésped, ya sean en animales o en seres humanos, son las mucosas del tracto digestivo y respiratorio, donde es capaz de sobrevivir entre las células fagocíticas y no fagocíticas del huésped (Baldi, Samartino, & Giambartolomei, 2013). En los huéspedes naturales, la conjuntiva y las membranas de los órganos sexuales también permiten la entrada de la bacteria (von Bargen, Gorvel, & Salcedo, 2012). Cuando entra en el huésped, la bacteria ataca a los macrófagos donde puede sobrevivir y multiplicarse, inhibiendo la fagocitosis, para después diseminarse por otras células del cuerpo.

El éxito que posee *Brucella* al momento de ingresar en el huésped se debe principalmente por el LPS-S, el cual ha demostrado tener un importante papel en la entrada y la evasión del sistema inmunológico en las células infectadas. La bacteria que ingresa en la célula huésped tiene la capacidad de alterar la presentación del antígeno al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, protegiendo a la célula infectada del ataque por parte del sistema inmunológico (Christopher, Umamathy, & Ravikumar, 2010). También se ha identificado receptores

Toll/Interleucina-1 (TIR) en la bacteria que interfieren con la señalización de los receptores TLR, inhibiendo así la maduración de las DC y, por ende, alterando la presentación de antígeno (Neta et al., 2010).

Después de que infectan a las células fagocíticas, la bacteria se dirige a los nodos linfáticos regionales donde será transportada a otros órganos por medio de la linfa. Los macrófagos y monocitos del hígado y bazo presentan el mejor ambiente para la multiplicación de la bacteria, aunque en los animales se puede encontrar una alta concentración en los trofoblastos de la placenta. Estas células placentarias producen eritritol durante el tercer trimestre de gestación, el cual genera un ambiente favorable como fuente de carbono para *Brucella* y su replicación, produciendo así los abortos o la infección de fetos no nacidos durante este periodo (von Barga et al., 2012).

2.4 Transmisión

Las especies de *Brucella* pueden transmitirse de forma vertical u horizontal. La transmisión vertical (transplacentaria o por lactancia) ocurre cuando la infección pasa de la madre al hijo antes, durante y después del parto (Díaz et al., 2000). En la transmisión horizontal, los animales se infectan con *Brucella* cuando entran en contacto directo con los líquidos fetales, la placenta y las descargas vaginales de animales infectados (Moreno, 2014). *B. abortus* suele transmitirse después de un aborto o parto, además de que se encuentran en otros fluidos como la leche, orina, semen, heces y el líquido de los higromas. *B. canis* puede ser eliminada por los perros durante los partos, sin presentar algún síntoma (CFSPH, 2009).

La transmisión sexual depende mucho de la especie de *Brucella*, siendo el caso de *B. ovis* que tiene esta vía como su principal forma de transmisión. *B. abortus* y *B. melitensis* se encuentran presentes en el semen de los animales pero no es común que se transmitan por vía sexual. Se han reportado casos de infección de animales por medio de inseminación artificial cuando el semen contaminado se deposita en el útero (IICAB, 2009).

Los fómites permiten que *Brucella* se propague por medio de alimentos y agua, especialmente si las condiciones son favorables para su sobrevivencia por meses como humedad alta, bajas temperaturas y poca luz solar. También pueden encontrarse en el estiércol, lana, heno,

ropa y materiales de trabajo. (CFSPH, 2009). El tiempo de supervivencia de la bacteria en el medio ambiente se detalla en la Tabla 2.

En el ser humano, la infección con *Brucella* se debe principalmente por el manejo de animales infectados, así como del consumo de productos lácteos no pasteurizados (Moreno, 2014), ingestión de carne cruda o productos cárnicos con poca cocción.

Dentro de los laboratorios o mataderos, una de las formas de transmisión son los aerosoles, donde la bacteria infectará a la persona por contacto con las mucosas o piel lastimada. Una persona también puede infectarse debido al contacto accidental con vacunas atenuadas contra brucelosis (CFSPH, 2009).

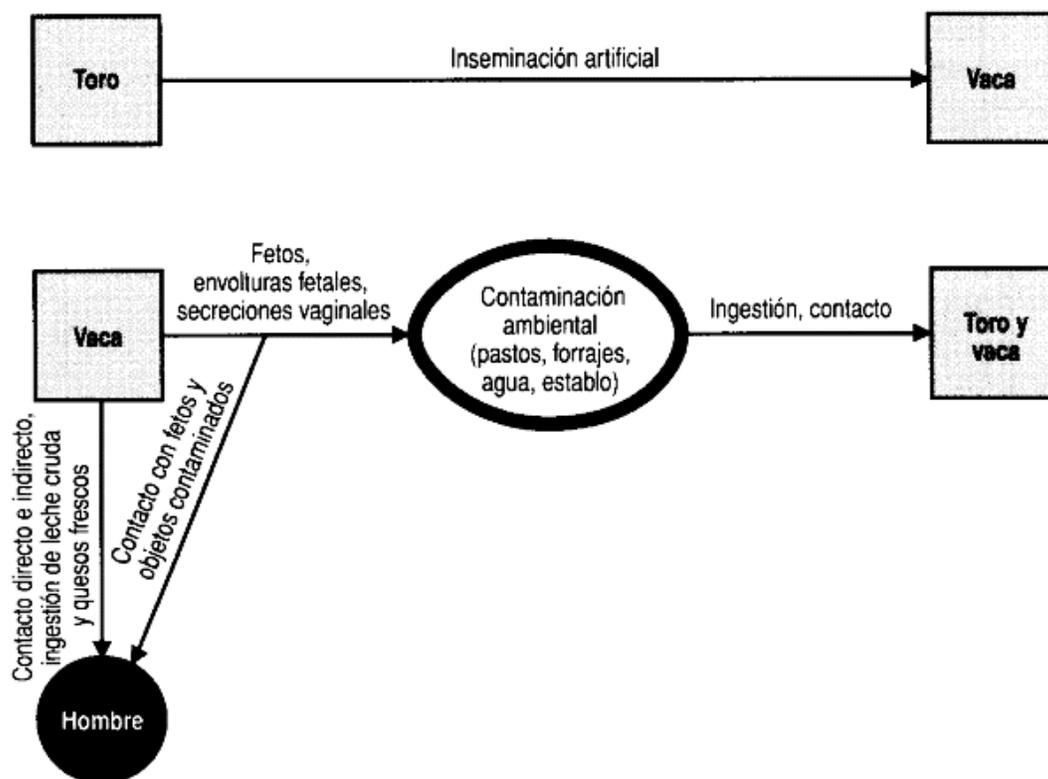


Figura 2. Modo de transmisión de la brucelosis bovina (*Brucella abortus*).

Fuente: Acha & Szyfres (2001).

La transmisión de persona a persona es poco común, habiendo pocos repotes de una transmisión vertical y horizontal entre los seres humanos (Moreno, 2014). Se han dado casos en donde la brucelosis se ha transmitido a través de transfusiones de sangre o trasplantes de médula

ósea, así como se han reportado de manera poco frecuente las infecciones congénitas debidas a una transmisión transplacentaria o la ingesta de leche materna (CFSPH, 2009).

Tabla 2

Condiciones para la supervivencia de Brucella en el medio ambiente

Material	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7.5	Menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6.5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

°C: Grados centígrados; pH: Potencial de hidrógeno.

Fuente: Castro et al. (2005).

2.5 Respuesta inmunológica

Al momento en que *Brucella* ingresa al huésped, se desencadena una respuesta inmune innata, donde la bacteria es reconocida por neutrófilo, macrófagos y células dendríticas (DC) (Castro et al., 2005). El reconocimiento de *Brucella* involucra receptores tipo Toll (TLR) que presentan una función antimicrobiana. Los receptores TLRs son estimulados por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) bacterianos como lipoproteínas, LPS, flagelina y ADN. Cada uno de estos PAMPs es reconocido por un TLR diferente (Neta et al., 2010).

El LPS de *B. abortus* es reconocido por los linfocitos CD14, que se conectan con unas moléculas con dominios transmembrana necesarios para la señalización de los receptores TLR4,

receptores que reconocen a LPS, y que estimularán la respuesta inmune (Neta et al., 2010). Cuando TLRs reconocen los PAMPs, se activa el factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88). Este factor es crítico en el desarrollo de la respuesta inmune contra *B. abortus* puesto que permite la activación de los macrófagos, la liberación de citosinas pro-inflamatorias por vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ), así como de la activación y maduración de las DC (Copin, De Baetselier, Carlier, Letesson, & Muraille, 2007).

La liberación de interferón gamma (IFN- γ) por parte las células T se debe a la activación de las DC. En presencia del LPS-S de la bacteria, las DC liberan interleucina 12 (IL-12) que estimularán las células CD4+ (Neta et al., 2010). La secreción de IL-12 también estimulará la activación de las células *natural killer* (NK), que secretarán IFN- γ , mediando así una respuesta inmune adaptativa mediada por células tipo TH1 (Castro et al., 2005).

En el caso de *B. abortus*, la producción de IL-12 y la activación de las células tipo TH1, junto con el factor de necrosis tumoral (TNF α), favorecen a la resistencia celular frente a la bacteria (Saldarriaga & Rugeles, 2002).

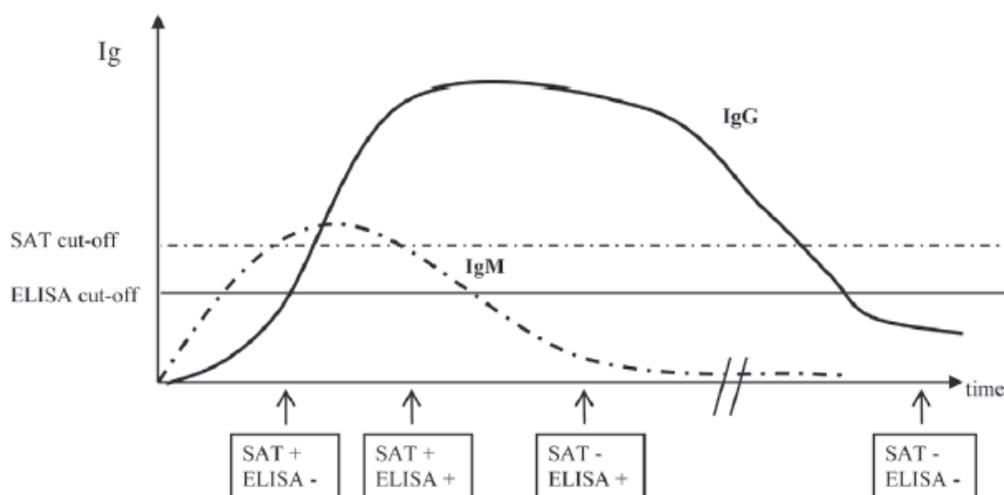


Figura 3. Cinética de respuesta inmune inducida junto con las diferentes pruebas realizadas después de la infección con *Brucella abortus* en bovinos. **IgG:** Inmunoglobulina G; **IgM:** Inmunoglobulina M; **SAT:** Seroaglutinación lenta en tubo; **ELISA:** Ensayo inmunoenzimático; **Cut-off:** Punto de corte.

Fuente: Godfroid, Nielsen & Saegerman (2010).

La cinética de los principales isotipos de inmunoglobulinas durante la infección, junto con las diferentes pruebas serológicas que las identifica, permite diferenciar entre una fase aguda o crónica de la enfermedad, tal como se describe en la *Figura 3* (Godfroid et al., 2010). Durante la fase aguda de la infección por *B. abortus* aparecen principalmente anticuerpos del tipo IgM, los cuales empezarán a decaer, mientras van apareciendo los anticuerpos tipo IgG. En la fase crónica, se observa la presencia mayoritariamente de anticuerpos del tipo IgG con niveles bajos de IgM, lo que permite determinar el estado de la infección del animal mediante las pruebas de diagnóstico serológicas (Saldarriaga & Rugeles, 2002).

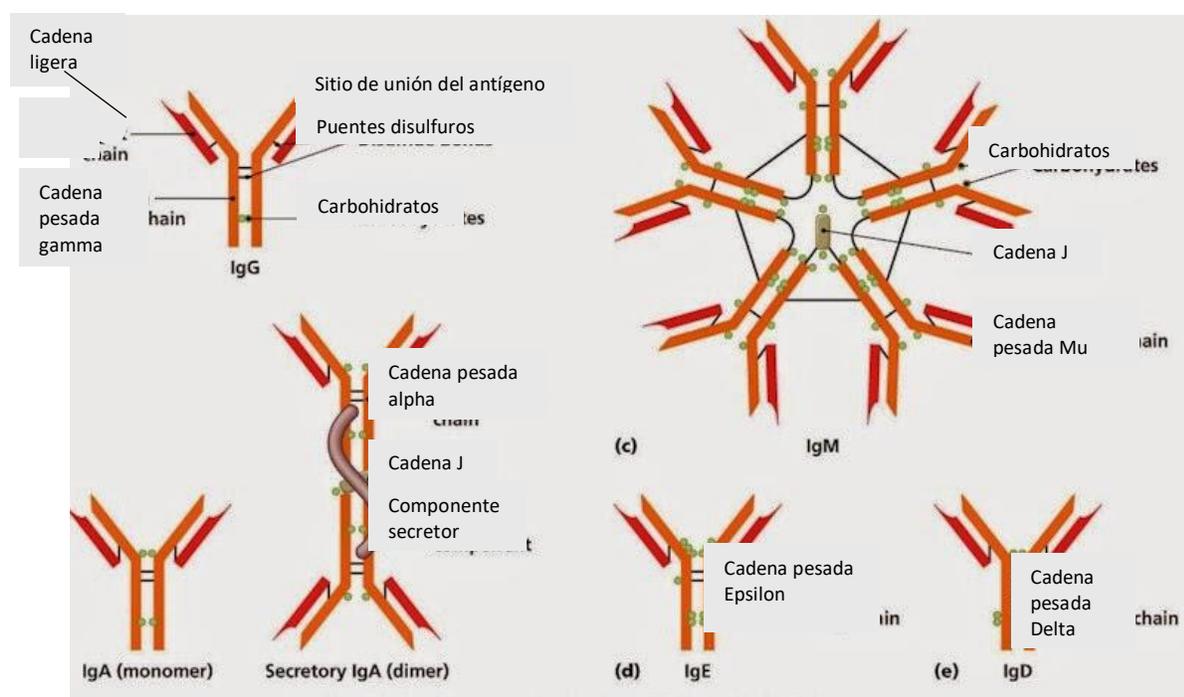


Figura 4. Representación de los isotipos y estructura de las inmunoglobulinas.

Fuente: Alba (2015).

2.6 Signos clínicos

La infección por *Brucella* se caracteriza por abortos, infertilidad y retención de la placenta en las hembras, y de orquitis e infertilidad en machos. Las hembras no presentan sintomatología hasta que abortan durante la segunda mitad de la gestación (OIE, 2010).

En la brucelosis bovina, principalmente ocasionado por *B. abortus*, se encuentran signos clínicos como retención de placenta y metritis secundaria. Los terneros que nacen de madres

infectadas generalmente son débiles y tienen poco tiempo de vida, así como puede haber una disminución en el período de lactancia (IICAB, 2009).

La infección por *B. abortus* también provoca otros síntomas que se pueden observar tanto en bovinos como en otros animales rumiantes. Entre los síntomas se encuentra epididimitis, vesiculitis seminal y abscesos testiculares. Las muertes provocadas por esta infección son poco comunes. En climas tropicales se observan higromas. En los caballos se observa la cruz fistulosa que hace referencia a la inflamación de las bolsas articulares supraespinosa y supraatlantal (IICAB, 2009).

2.7 Métodos de diagnóstico

2.7.1 Métodos directos

2.7.1.1 Diagnóstico bacteriológico

Los métodos para el diagnóstico bacteriológico buscan determinar la presencia de la bacteria en los tejidos o secreciones de animales o seres humanos. El aislamiento de la bacteria consiste en la inoculación de secreciones o tejidos en un medio de cultivo enriquecido, como agar triptosa o medio base tipo Columbia para *Brucella*, para que la bacteria crezca, determinando su presencia en el animal (OIE, 2016a). Para el aislamiento de *B. abortus* se emplea el medio selectivo de Farrell que contiene antibióticos para los cuales la bacteria presenta resistencia. Las colonias de *Brucella* se pueden observar después de 3-5 días en incubación (Blasco, 2001).

El problema de este método es el riesgo que presenta el cultivo de la bacteria, debido a que puede infectar a los trabajadores que manipulen las muestras o siembra. Se requiere un nivel de seguridad 3 en el laboratorio para realizar estas pruebas (Blasco, 2001; Gómez, 2016).

2.7.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es un método molecular para la identificación de las especies de *Brucella* que presenta una especificidad del 100%, pero con una baja sensibilidad del 70% (Asaad & Alqahtani, 2012). Debido a que las especies del género *Brucella* poseen un alto grado de homología, esta técnica permite detectar las pequeñas diferencias entre las especies y algunas de sus biovariedades (OIE, 2016b).

La técnica se centra en la identificación y amplificación de un fragmento específico de cada especie. Algunas PCR diseñadas han utilizado un fragmento del gen *omp2* debido a que el tamaño del fragmento difiere en las especies de *Brucella*, permitiendo así su diferenciación. También se ha empleado la secuencia de inserción IS6501 (Díaz et al., 2000) o el gen *bcp31* (Gómez, 2016).

2.7.2 Métodos indirectos

Los métodos indirectos buscan determinar la presencia de la bacteria mediante la identificación de una respuesta inmune humoral o celular, contra antígenos específicos de *Brucella* (Blasco, 2001).

Algunas de las pruebas indirectas que se utilizan son: prueba de aglutinación rápida en placa (Rosa de Bengala), seroaglutinación lenta en tubo o de Wright (SAT), fijación del complemento (FC), ensayo inmunoenzimático indirecto y competitivo (iELISA, cELISA), y prueba de anillo coloreado en leche (Wang et al., 2015).

2.7.2.1 Prueba de aglutinación rápida en placa (Rosa de Bengala)

Es una prueba rápida y sencilla que se fundamenta en la aglutinación del antígeno coloreado con Rosa de Bengala (pH 3.65 ± 0.05) sobre una lámina de vidrio o plástico esmaltado, junto con los anticuerpos presentes en el suero de estudio.

El antígeno para la prueba proviene de la cepa de *B. abortus* S99 o S1119-3, inactivadas (OIE, 2016b). Esta prueba detecta la presencia de anticuerpos del tipo IgM e IgG, aunque el medio ácido del colorante favorece la unión del antígeno con anticuerpos del tipo IgG1 (Allan, Chappel, Williamson, & McNaught, 1976; M. J. Corbel, 1972).

Los resultados obtenidos son cualitativos y pueden existir falsos negativos debido a casos donde la infección sea inicial, así como falsos positivos donde el antígeno reacciona con anticuerpos debidos a la vacunación (Ron-Román, 2003). La prueba tiene una sensibilidad del 94% y especificidad del 100% (Nielsen, 2002).

2.7.2.2 Prueba de seroaglutinación lenta en tubo o prueba de Wright (SAT)

Es una prueba que se fundamenta en la aglutinación de anticuerpos del tipo IgM, y en menor cantidad IgG (Ron-Román, 2003), junto con el antígeno, el cual es una suspensión de la cepa 99 o 1119-3 de *B. abortus* en una solución fenolada, a la cual se puede añadir EDTA para disminuir la presencia de falsos positivos (OIE, 2016b). El procedimiento se lo realiza mediante una serie de diluciones en una microplaca y los resultados se reportan de forma semi-cuantitativa.

2.7.2.3 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)

El ELISA indirecto es una prueba que detecta anticuerpos contra los antígenos de *Brucella*, el cual proviene de la cepa 99 o 1119-3 de *B. abortus*, o la cepa 16M de *B. melitensis*. En las pruebas comerciales, los LPS-S o los O-polisacáridos (OPS) son empleados como antígenos (OIE, 2016b). La técnica se realiza en una placa de poliestireno donde se coloca el suero, los anticuerpos anti-IgG bovino conjugado a una enzima (peroxidasa) y un cromógeno o sustrato. El resultado es una reacción colorimétrica donde la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en el suero de estudio (SENASA & OIE, 2009).

A pesar que se considera al ELISA indirecto como una técnica muy sensible, casi es incapaz de diferenciar entre los animales vacunados con cepa 19 y los animales infectados de forma natural, impidiendo así que se la utilice como una prueba confirmatoria (OIE, 2016b).

2.7.2.4 Ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA)

El ELISA competitivo (cELISA) es una técnica que tiene como fundamento la competencia diferencial entre anticuerpos monoclonales y los anticuerpos debidos a la vacunación con cepa 19, frente al antígeno LPS-S de *B. abortus* (Godfroid et al., 2010; Nielsen, Kelly, Gall, Nicoletti, & Kelly, 1995). Los anticuerpos monoclonales también pueden competir con los anticuerpos debidos a una infección natural, o debidos a otros factores no específicos (Díaz et al., 2000).

El método empieza con la fijación del antígeno LPS-S en una placa de poliestireno, donde se colocarán los sueros diluidos y el anticuerpo monoclonal de ratón, específicos para la cadena O. Se agrega el conjugado, el cual es un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a una peroxidasa, y el sustrato o cromógeno. Cuando el suero diluido presenta anticuerpos contra *Brucella*, estos competirán con los anticuerpos monoclonales por epítipo del LPS y existirá una ausencia de color (OIE, 2016b).

Por otro lado, cuando no se encuentran presentes anticuerpos contra *Brucella*, los anticuerpos monoclonales se unirán al antígeno y se observará un cambio en el color (OIE, 2016b). Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad, que omite los falsos positivos (Wang et al., 2015).

2.7.2.4.1 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos son glicoproteínas del tipo inmunoglobulina o globulina gamma, secretadas por los linfocitos B en presencia de los antígenos. De las tres moléculas que emplea el sistema inmunitario para unirse a los antígenos, las inmunoglobulinas presentan el mayor rango de discriminación entre diferentes antígenos y una unión fuerte entre anticuerpo-antígeno (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014).

Un anticuerpo monoclonal (mAb), comparado con las inmunoglobulinas, presentan afinidad a un solo epítipo de un antígeno o mezcla de antígenos y es secretado por células que provienen de una sola célula ancestral (Kimball, 2011). El primero mAb obtenido en el laboratorio fue por medio de la técnica del hibridoma, desarrollado por Georges Kohler y Cesar Milstein en 1975. Esta técnica se basa en la fusión y cultivo de linfocitos B generados al inmunizar a un animal con un antígeno específico, para la formación de hibridomas. Posteriormente, las inmunoglobulinas que son secretadas por cada hibridoma serán probadas para determinar su respuesta frente al antígeno, expandiendo así los clones de hibridomas que presenten la especificidad requerida (Abbas et al., 2014).

Otra forma de producción de mAbs es la técnica de fago display. Esta técnica se basa en la formación de librerías de secuencias de diferentes regiones Fab de inmunoglobulinas. Las secuencias de los genes que codifican la región Fab, que se encuentran en los linfocitos B, son introducidas en un vector y clonadas en un bacteriófago, donde las secuencias serán expresadas

en la cápside del virus. Las proteínas que son generadas con diferentes regiones Fab son probadas para determinar la especificidad frente a un tipo de antígeno, seleccionando y clonando a los plásmidos que contengan la secuencia de la región Fab deseada (Carvalho et al., 2017).

Los mAbs presentan aplicaciones importantes dentro del diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En la técnica de diagnóstico cELISA se emplean mAbs para aumentar la especificidad de la prueba y eliminar los falsos positivos por reacciones cruzadas con otras bacterias (OIE, 2016a; Perrett, McGiven, Brew, & Stack, 2010).

2.8 Prevención y control

2.8.1 Tratamiento

La brucelosis en animales de producción se considera como una enfermedad intratable, no sólo porque las especies de *Brucella* (específicamente *B. abortus*) son en cierta medida resistentes a los antibióticos (Orduña et al., 2001), sino también por lo costoso del tratamiento y las consecuencias del uso de altas dosis de antibióticos en la producción de carne y productos lácteos. Además, al ser bacterias facultativas intracelulares, los animales tienden a sufrir recaídas incluso después de haber aplicado el tratamiento (CABI, 2017).

En Ecuador, cuando un animal es positivo para brucelosis, se realiza un sacrificio sanitario para evitar la propagación de la enfermedad (AGROCALIDAD, 2016b).

2.8.2 Control

El control de la brucelosis en animales de producción necesita de una legislación que permita su erradicación eficaz de un país, así como su vigilancia posterior (CABI, 2017). Según la OIE (2016b), el control de la enfermedad en un país o región se debe realizar mediante pruebas como Rosa de Bengala (RB), Seroaglutinación lenta en tubo (SAT) y Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). Los animales que sean positivos a estas pruebas tamiz, deben ser sometidos a pruebas confirmatorias adecuadas.

Cuando se sospecha que un hato está infectado con la bacteria, se debe realizar un monitoreo de los animales con las pruebas tamiz recomendadas. Cada animal debe ser sometido a las pruebas hasta que ninguno de ellos arroje resultados positivo a dichas pruebas. Los animales que sean positivos deben ser separados del hato y posteriormente ser sacrificado (AGROCALIDAD, 2009; CABI, 2017).

En áreas donde la brucelosis es endémica, sólo un buen plan de manejo y control de la enfermedad permitirá el control de la enfermedad. En Ecuador se plantea un Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina (AGROCALIDAD, 2009) en donde se contempla la vacunación, pruebas sanguíneas continuas que abarca RB, prueba del anillo en leche cruda (MRT) y cELISA, un adecuado manejo de la finca y la eliminación de los animales infectados como medidas de control y erradicación de la enfermedad.

2.8.2.1 Vacunas utilizadas en animales

Las vacunas han sido desarrolladas a partir de cepas vivas atenuadas o cepas muertas con capacidad inmunogénica, siendo su objetivo es proteger a los animales de la infección por *Brucella* (Saldarriaga & Rugeles, 2002). Las vacunas utilizadas en animales se describen en la Tabla 3.

Según AGROCALIDAD (2016b), en el Ecuador, las vacunas que se utilizan para prevenir la brucelosis en el ganado son:

- Cepa 19, con una dosis única subcutánea de $5-8 \times 10^{10}$ microorganismos viables en terneros de 3-6 meses.
- Cepa RB51, con una dosis de $1-3.4 \times 10^{10}$ microorganismos/2 mL en hembras desde los 4 meses de edad.

Tabla 3*Cepa, derivación, inmunogenicidad y desventajas de las vacunas utilizadas en animales*

Cepa	Derivación	Efectivo contra	Inmunogenicidad	Desventaja
Cepas vacunales lisas				
B19	Leche derivada de una hembra infectada	<i>B. abortus</i>	Relativamente virulenta	Similitud antigénica con las cepas de campo. Puede causar abortos.
REV-1	Placenta de un aborto de oveja	<i>B. melitensis</i>	Alta	Patógena para el ser humano. Anticuerpos específicos contra LPS dificultan el serodiagnóstico de la infección natural.
S2	Pasaje seriado de cepa <i>B. suis</i> biovar 1, origen suino	<i>B. suis</i>	Relativamente virulenta	No protege contra la infección transmitida por contacto sexual.
Cepas vacunales rugosas				
RB51	Cepa virulenta 2308 de <i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i> <i>B. ovis</i>	No produce respuesta humoral	Persistencia en los nódulos linfoides.
M111	Cepa lisa de <i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	Menos virulenta que la cepa S2	

LPS: Lipopolisacárido. **Fuente:** Saldarriaga & Rugeles (2002).

2.9 Distribución geográfica

2.9.1 Distribución mundial

Las especies de *Brucella* se encuentran distribuidas alrededor del mundo, siendo controlada en algunos países desarrollados. La enfermedad se encuentra todavía en Medio Oriente, Asia, África, Cuenca Mediterránea, América Central y del Sur, y el Caribe (CFSPH, 2009; OIE, 2016a). La distribución de la enfermedad humana dependerá de tres factores importantes como la distribución de la brucelosis animal, los hospederos animales y la especie y biovariedad que se encuentre en los animales hospedadores (Diaz et al., 2001). La distribución de las especies más conocidas de *Brucella* se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4

Distribución geográfica, características epidemiológicas, huésped habitual y biovariedades de las especies de Brucella

Especie	Biovariedades	Distribución geográfica principal	Animal huésped habitual	Patogenicidad en los seres humanos
<i>B. abortus</i>	1 a 6, y 9	Todo el mundo	Bovinos, ungulados silvestres	Moderado
<i>B. melitensis</i>	1 a 3	Mediterráneo, Oriente Medio	Ovinos, caprinos, ungulados silvestres	Fuerte
<i>B. suis</i>	1 y 3	América, Asia, Oceanía	Cerdos	Fuerte
<i>B. suis</i>	2	Europa Central y Occidental	Cerdos y liebres	Débil
<i>B. suis</i>	4	América del Norte, Rusia	Renos	Moderada
<i>B. suis</i>	5	Rusia	Roedores silvestres	Fuerte
<i>B. canis</i>		Todo el mundo (alta frecuencia en América del Sur)	Perros	Débil
<i>B. ovis</i>		Mediterráneo	Ovinos	Nula
<i>B. neotomae</i>		Utah (Estados Unidos)	Ratas del desierto	Desconocido

Fuente: Maurin (2005).

La brucelosis se encuentra dentro de la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE. La distribución de la brucelosis en animales según la OIE hasta el año 2005 se detalla en el siguiente mapa (*Figura 5*), siendo Groenlandia y la Isla Madagascar lugares donde no se ha evidenciado la presencia de la enfermedad.

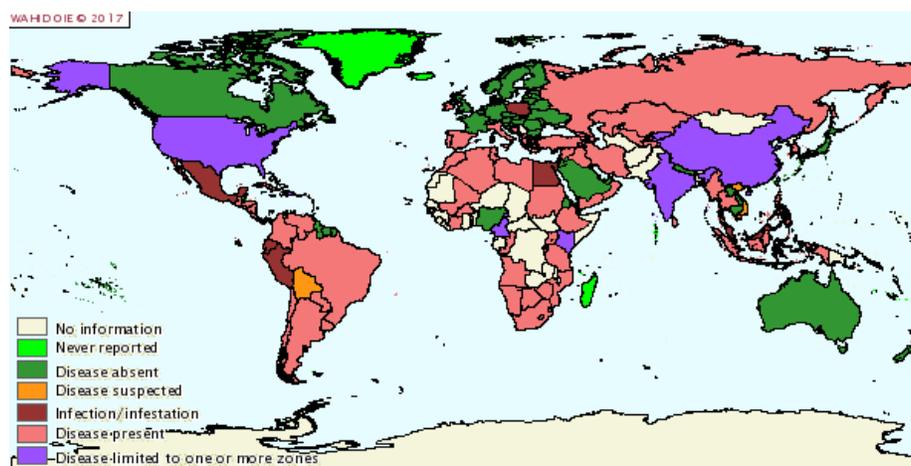


Figura 5. Distribución a nivel mundial de la enfermedad de brucelosis.

Fuente: OIE (2005).

Según algunos reportes recolectados por el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (CABI, 2017), la brucelosis se encuentra distribuida a nivel mundial de acuerdo a lo descrito en el siguiente mapa (Figura 6), en donde la República Central de África, el Congo, Somalia y Pakistán presentan actualmente la enfermedad.

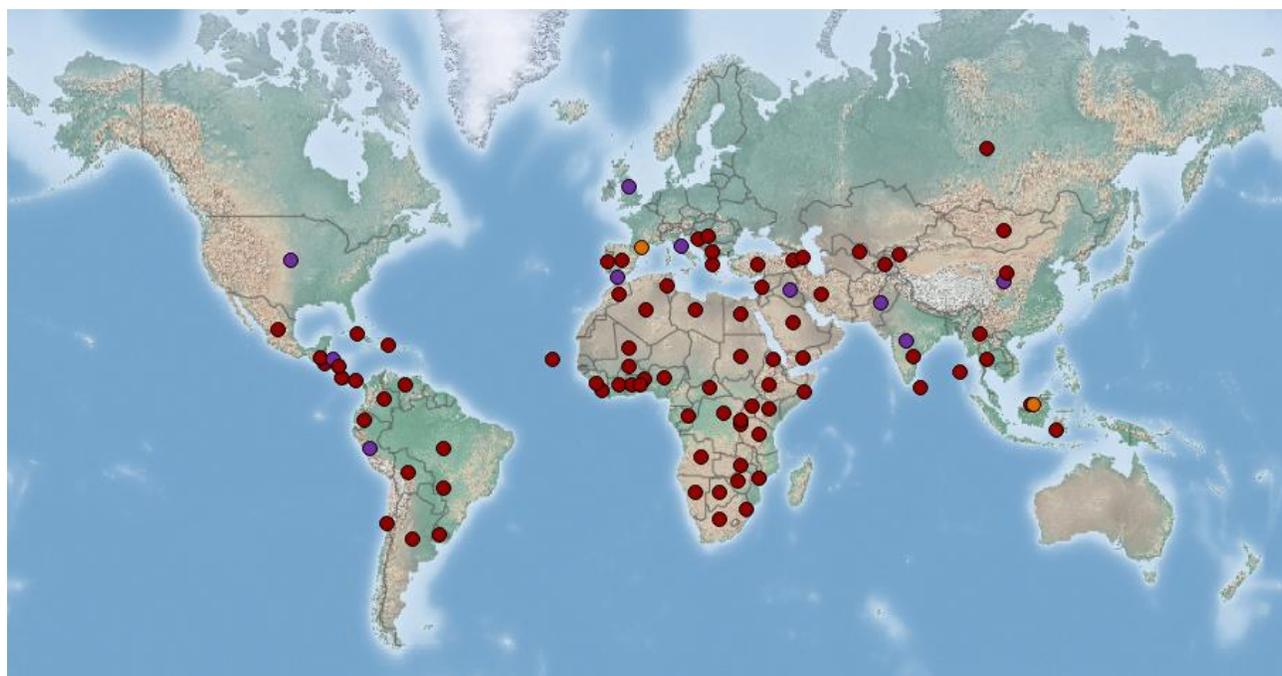


Figura 6. Distribución mundial de brucelosis en ganado según el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (CABI).

■ = Enfermedad presente. ■ = Enfermedad localizada. ■ = Evidencia del patógeno.

Fuente: Centro de Biociencia Agrícola Internacional (2017).

2.9.2 Distribución en Latinoamérica

En Latinoamérica, la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida entre algunos países. No existe información sobre el último reporte de la enfermedad, pero según el CABI (2017), la enfermedad se encuentra distribuida según la Tabla 5.

De todos los países que conforman Latinoamérica, los países Barbados, Belice, Islas Vírgenes Británicas, Trinidad y Tobago, e Islas Falkland nunca han reportado la enfermedad; Islas Caimán, Curazao, Dominica, Jamaica, Martinica, Guayana Francesa y Guayana no han reportado la enfermedad actualmente; y los países Haití, Guadalupe y Uruguay no disponen de

información. Los demás países presentan la enfermedad o tienen una distribución restringida (Figura 7).

Tabla 5
Distribución de la brucelosis a nivel de Latinoamérica.

País	Distribución
Argentina	Presente
Barbados	Enfermedad nunca reportada
Belice	Enfermedad nunca reportada
Bolivia	Presente
Brasil	Presente
Chile	Presente
Colombia	Presente
Costa Rica	Presente
Cuba	Presente
Curazao	Enfermedad no reportada
Dominica	Enfermedad no reportada
El Salvador	Presente
Guadalupe	Información no disponible
Guatemala	Presente
Guayana	Enfermedad no reportada
Guayana Francesa	Enfermedad no reportada
Haití	Información no disponible
Honduras	Distribución restringida
Islas Caimán	Enfermedad no reportada
Islas Falkland	Enfermedad nunca reportada
Islas Vírgenes Británicas	Enfermedad nunca reportada
Jamaica	Enfermedad no reportada
Martinica	Enfermedad no reportada
México	Presente
Nicaragua	Presente
Panamá	Presente
Paraguay	Información no disponible
Perú	Distribución restringida
República Dominicana	Presente
Trinidad y Tobago	Enfermedad nunca reportada
Uruguay	Presente
Venezuela	Presente

Fuente: CABI (2017).



Figura 7. Distribución de la brucelosis en los países latinoamericanos.

■ = Enfermedad presente. ■ = Enfermedad localizada.

Fuente: CABI (2017).

2.9.3 Distribución en Ecuador

En Ecuador, el país se ha dividido en regiones según la prevalencia de la enfermedad en la zona, resultando en cinco regiones epidemiológicas (*Figura 8*):

- **Región 1** (Alta prevalencia - Sierra): integrada por las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo. Esta región presenta una prevalencia del 1.97-10.62%.

- **Región 2** (Alta prevalencia - Costa): integradas por las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas, Los Ríos, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas. Esta región presenta una prevalencia de 4.2-10.62%.
- **Región 3** (Baja prevalencia): integrada por las provincias de Bolívar, Cañar, Azuay y Loja. La prevalencia de la enfermedad en esta región es de 1.3-2.6%.
- **Región 4** (Baja prevalencia): integrada por las provincias amazónicas donde se estima una prevalencia baja de la enfermedad debido a los sistemas de producción.
- **Región 5** (Indemne): integrada por las Islas Galápagos. La prevalencia de la enfermedad se considera del 0%.

(AGROCALIDAD, 2009)

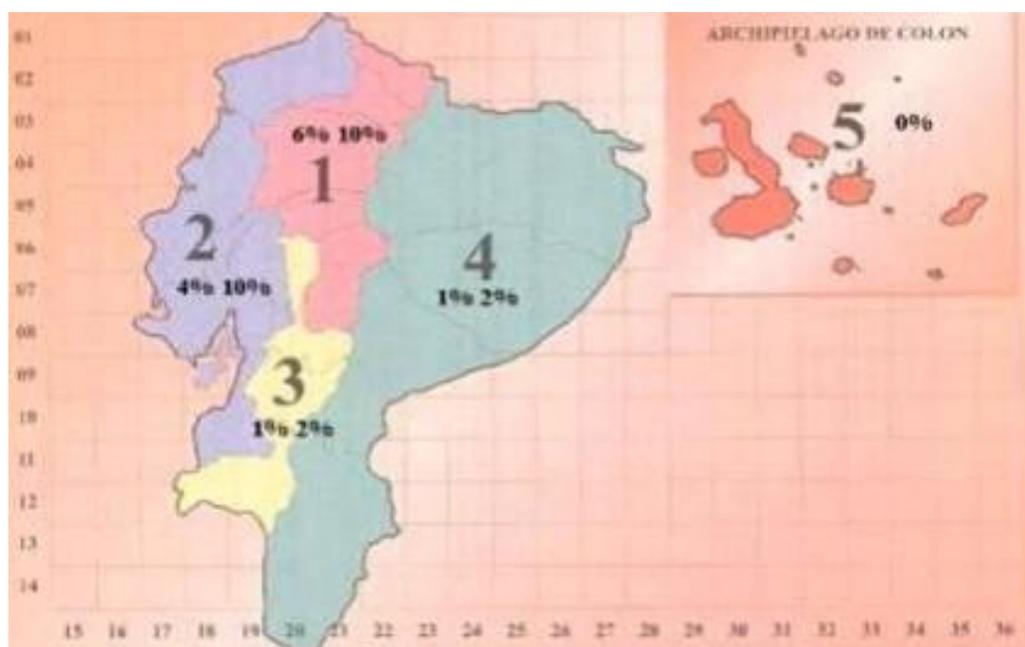


Figura 8. Regiones epidemiológicas de brucelosis bovina en Ecuador.

Fuente: AGROCALIDAD (2009).

2.10 Lineamientos del Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina en Ecuador

El Programa Nacional de Brucelosis Bovina (AGROCALIDAD, 2009), así como el Manual de Procedimientos para la Prevención y Control de Brucelosis Bovina en el Ecuador

(AGROCALIDAD, 2016b), establecen actividades específicas para el control y prevención de la brucelosis.

El Programa fue aprobado el 18 de junio de 2008, y se tiene como objetivo el reducir progresivamente la brucelosis bovina en todo el país. Para lograrlo, se han establecido actividades como (AGROCALIDAD, 2009):

1. Sensibilización, promoción y difusión del Programa.
2. Vigilancia epidemiológica.
3. Diagnóstico e identificación de animales positivos.
4. Vacunación de terneras.
5. Certificación de predios libres de brucelosis.

AGROCALIDAD, como Organismo Oficial regulador a nivel nacional, es el encargado de difundir el Programa a los ganaderos y gremios productores, y capacitando a los participantes del Programa en las medidas para la prevención, control y erradicación de la enfermedad.

La vigilancia epidemiológica trata de obtener y proporcionar la información necesaria para identificar la enfermedad, así como para prevenirla. Esta vigilancia permitirá prever los cambios en el estado del ganado. Se manejan dos tipos de vigilancia:

- **Vigilancia Pasiva:** donde se realiza la notificación de una sospecha o la presencia de la enfermedad dentro de un predio. De acuerdo a ello, AGROCALIDAD tomará las medidas necesarias para confirmar o controlar la situación.
- **Vigilancia Activa:** cuenta con planes de monitoreo periódicos para el control y prevención de la enfermedad, incluyendo un muestreo de los animales que ingresen a ferias de exposición y subastas ganaderas.

Durante la vigilancia de la enfermedad, se realizará el diagnóstico e identificación de los animales positivos mediante pruebas tamiz y confirmatorias, como son RB y cELISA (AGROCALIDAD, 2016a). Los animales que sean sospechosos de tener la enfermedad, serán aislados del hato y puestos en cuarentena. Cada animal será muestreado y posteriormente será sometido a las pruebas confirmatorias.

Cualquier animal que sea positivo a la enfermedad será marcado con la letra “B” en el músculo masetero, se aplicarán las medidas de bioseguridad necesarias para la eliminación de cualquier reactor positivo, se implementarán calendarios de vacunación con la vacuna RB51 en los predios que no vacunen, y finalmente se realizará la vacunación de población susceptible en los predios (AGROCALIDAD, 2016b).

2.10.1 Vacunación terneras

El esquema de vacunación que maneja AGROCALIDAD (2016b) consta de tres estatutos:

1. Vacunar hembras de tres a seis meses de edad, utilizando una sola dosis de la vacuna Cepa 19.
2. No se debe vacunar a los machos.
3. Las vacunas permitidas para su uso por AGROCALIDAD son la Cepa 19 y RB51.

2.10.2 Esquema para certificación de predios libres

Un predio libre hace referencia al lugar donde los animales presenten resultados negativos a las pruebas de tamiz (RB) y a la prueba confirmatoria (cELISA). Los animales que sean sometidos a estas pruebas de verificación serán las hembras mayores de 12 meses. Si se ha vacunado con RB51, se realizarán las pruebas a todas las hembras mayores de 18 meses. Si se ha vacunado con Cepa 19, se realizarán las pruebas a los machos mayores de 6 meses (AGROCALIDAD, 2016b).

Para la certificación de predios libres se requiere se cumplan ciertas medidas:

- a. Ganaderos, productores e industrias deben presentar voluntariamente su deseo de participar en el proceso de certificación de predios libres de brucelosis.
- b. Tanto los ganaderos, productores e industrias, como los ejecutores del programan forman un equipo para cumplir con las tareas sanitarias de campo, análisis serológicos (*Figura 9*), identificación de animales positivos y administración financiera del proyecto.
- c. AGROCALIDAD será el responsable de establecer las medidas que se seguirán en cada predio según sus condiciones sanitarias y estado epidemiológico, y otorgará los certificados de predios libres de brucelosis.

(AGROCALIDAD, 2009)

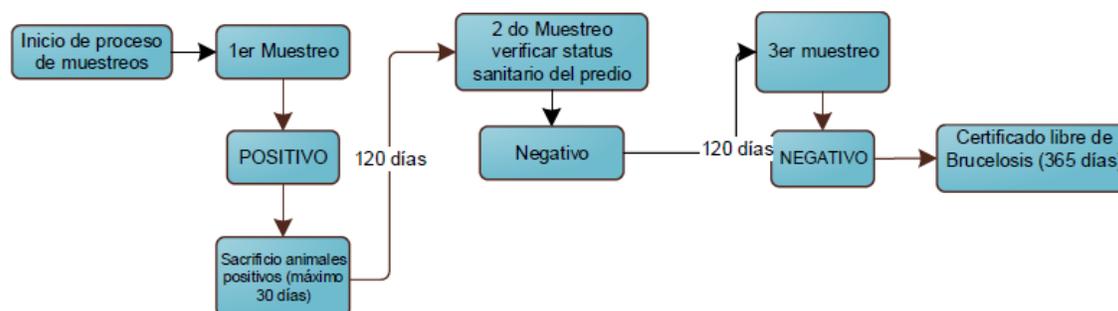


Figura 9. Certificación de Predios Libres.

Fuente: AGROCALIDAD (2016a).

2.11 Sistema de Hipótesis

Ho: El ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) no detecta anticuerpos del tipo IgG contra *Brucella* spp. en el ganado bovino.

Hi: El ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) detecta anticuerpos del tipo IgG contra *Brucella* spp. en el ganado bovino.

CAPÍTULO 3 – MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fase de campo

Se realizaron muestreos en campo de 2 escenarios epidemiológicamente diferentes, obteniendo las muestras sanguíneas de ganado bovino para la optimización de la prueba.

- **Escenarios:**

- E1: Zonas de baja y moderada prevalencia de brucelosis**

- El Carmen - Manabí:** Se tomaron 56 muestras de suero sanguíneo bovino recolectadas en el trabajo de titulación de la Ing. Viviana Medina en el mes de marzo del 2016 dentro del Proyecto de vinculación: “Promover buenas prácticas de manejo ganadero, manufactura e inocuidad en productos lácteos”, realizado en 12 fincas ubicadas en la parroquia San Pedro de Suma, cantón El Carmen, provincia de Manabí.

- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD):** Se utilizaron 25 sueros donados por AGROCALIDAD, de los cuales se tuvo conocimiento previo que 14 sueros fueron positivos para *Brucella* y 11 negativos.

- E2: Zona indemne de brucelosis**

- Isla Santa Cruz, Islas Galápagos:** Se tomaron 85 muestras de suero sanguíneo bovino recolectadas por Ing. Jimmy Jumbo en el mes de noviembre del 2016 dentro del Proyecto de vinculación: “Métodos de diagnóstico biotecnológico de enfermedades en animales, buenas prácticas agropecuarias a través de capacitación y transferencia de tecnología en las Islas Galápagos”, realizado en 19 haciendas ubicadas en la Isla Santa Cruz, provincia Galápagos – Ecuador.

3.1.1 Recolección, procesamiento y conservación de muestras de sangre

La recolección de las muestras de sangre bovina se realizó siguiendo el procedimiento para la extracción a partir de la vena coccígea. La cola del animal se levantó en posición horizontal para la limpieza y desinfección de la zona entre las vértebras coccígeas 6-7 con alcohol al 70%, y posteriormente se realizó la punción en la vena mediante el uso de agujas Vacutainer

0.8 x 25 mm, calibre 21. La sangre se recolectó en tubos de 10 mL, tapa roja, sin anticoagulante, y se las almacenó en un cooler con gel refrigerante para mantenerlas a una temperatura baja por máximo 4 horas, hasta su disposición final en el laboratorio, donde se almacenó a -20 °C para la posterior extracción del suero (Weaver, St Jean, & Steiner, 2005).

3.2 Fase de laboratorio

Se realizaron cuatro pruebas para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, las cuales fueron Rosa de Bengala (RB), prueba de Seroaglutinación Lenta en Tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA), Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) y Ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA).

Todas las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

3.2.1 Obtención de suero sanguíneo

Los sueros se obtuvieron a partir de la centrifugación de tubos sin anticoagulante a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante (suero) se lo trasladó a tubos de tapa rosca de 2 mL, mediante el uso de pipetas Pasteur de plástico de 1 mL. Los tubos fueron etiquetados y almacenados a -20 °C.

3.2.2 Prueba de aglutinación rápida en placa (Rosa de Bengala)

Los sueros sanguíneos, previamente extraídos, y el antígeno coloreado con Rosa de Bengala (pH 3.65 ± 0.05) se colocaron a temperatura ambiente por 30 minutos antes de realizar la prueba. En una placa de vidrio se colocaron 30 μ L de la muestra de suero en cada celda y se añadió 30 μ L del antígeno cerca del suero. Se mezcló el suero y el antígeno con un palillo de madera, formando un círculo u ovalo. La placa se agitó suavemente por 4 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de los resultados mediante el uso de una lámpara y lupa (OIE, 2016b).

3.2.2.1 Interpretación de resultados

Los resultados se clasificaron como positivas o negativas según el grado de aglutinación presente en la placa.

- **Positivas:** cuando se observó la presencia de aglutinación y formación de borde coloreado definido en la celda. Se clasificaron los resultados como: (+) aglutinación fina, (++) aglutinación fina con borde no tan definido, y (+++) aglutinación gruesa con formación de borde definido.
- **Negativo:** cuando no se observó la presencia de aglutinación. La turbidez de la mezcla es homogénea, y se designó como (-)

(Ron-Román, 2003)

3.2.3 Prueba de seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA)

El procedimiento de esta prueba se realizó según lo descrito por Ron-Román (2003). En una placa de microtitulación se colocó 168 μL de tampón SAT (cloruro de sodio 0.85%, fenol 0.5%, EDTA 5 Mm, agua destilada) en la celda 1 y 100 μL en las celdas 2 a la 12. Se depositaron 32 μL de las muestras de suero en la celda 1 (1/12.5), y se tomaron 100 μL para colocarlos en la celda 2 (1/25). Se homogenizó y se volvieron a tomar 100 μL para colocarlos en la celda 3, y así se continuó hasta la celda 12 (1/25600). Al final se añadió 100 μL de la solución de antígeno (Antígeno 1/8.75, tampón SAT) y se incubó a 37 °C por 20 horas en ambiente húmedo.

3.2.3.1 Interpretación de resultados

Los resultados fueron leídos con la ayuda de un espejo de aumento y una lámpara, y se clasificaron según el grado de aglutinación presente.

- **Negativo:** cuando el antígeno forma un punto compacto y con bordes netos en el fondo de la cúpula.
- **Positivo 25%:** cuando el antígeno forma un punto compacto pero con bordes no tan definidos en el fondo de la cúpula.
- **Positivo 50%:** cuando el antígeno forma una fina capa de sedimento. No hay presencia de un punto compacto.
- **Positivo 100%:** cuando el antígeno forma una gran zona de sedimentación, repartida uniformemente en la cúpula. El líquido es completamente transparente.

Los porcentajes de aglutinación fueron determinados al compararlos con controles del antígeno. Los resultados se expresaron en Unidades Internacionales de aglutinación (UI) según la última dilución que presenta porcentaje de aglutinación (Tabla 6).

Tabla 6

Relación entre el grado de translucidez, dilución del suero a investigar y Unidades Internacionales según diluciones del suero control positivo

Dilución del suero	Porcentaje de translucidez de la muestra		
	25%	50%	100%
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

UI: Unidades Internacionales de aglutinación. **Cut-off:** 30 UI en bovinos. **Fuente:** Ron-Román (2003).

3.2.4 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)

El protocolo de esta prueba se realizó según lo descrito por Ron-Román (2003). El primer paso de esta prueba fue la sensibilización de cada pocillo de una placa de poliestireno con 100 μ L de una solución diluida 1/50 de LPS en tampón GS (glicina 1M, NaCl 1.7M, pH 9.2). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 3 horas 50 minutos y posteriormente se almacenaron a 4 °C por 12 horas.

Después de transcurrido el tiempo de sensibilización, las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado (NaCl 0.15M, Tween20 0.01% v/v) en un lavador de placas ELISA marca BioTek ELx50, escurriendo completamente el líquido. Se colocaron 50 μ L de la solución diluida 1/50 v/v de los sueros en tampón GS-EDTA-Tween80 (tampón GS 100 mL, EDTA 50 mM, Tween80 0.1% v/v, pH 9.2). El suero positivo (diluido previamente 1/10 en agua destilada) para la curva de calibración se diluyó 6 veces (1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, 1/8640) en

tampón BS (Tampón GS-EDTA-Tween80 10 mL, Suero bovino Bélgica negativo 200 µL). La placa se incubó a temperatura ambiente por 1 hora.

Se volvió a lavar la placa y se colocaron 50 µL de la solución de conjugado (Tampón conjugado 10 mL, NBCS 2% v/v, proteína G-HRPO 7.6 µL) diluido 1/50000. El tampón conjugado fue preparado con Hidrógeno fosfato de disodio 10 mM, NaCl 150 mM, Tween80 (diluido previamente 1/10 en agua destilada) 0.1% v/v, ajustando su pH a 7.2. La placa se volvió a incubar a temperatura ambiente por 1 hora, en oscuridad.

Para añadir la solución de sustrato (tampón de revelación 25 mL, oPD 1 tableta, Perhydrol® 5 µL), la placa se volvió a lavar 5 veces. La solución de revelación fue preparada con 1 tableta de tampón fosfato citrato en 100 mL de agua destilada. Se colocaron 100 µL de la solución de sustrato y se incubó la placa a temperatura ambiente por 20 minutos, en oscuridad. Se detuvo la reacción al agregar 25 µL de solución de parada (H₂SO₄ 2M). Las densidades ópticas fueron leídas en el espectrofotómetro BioTek ELx800, a 490-630nm.

3.2.5 Ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA)

La prueba de ELISA competitivo se optimizó en base al protocolo desarrollado por Claude Saegerman (Com. Pers. Ron-Román J. 2017) usando el antígeno LPS de *Brucella* spp.

Se sensibilizó cada pocillo de la placa de poliestireno con 100 µL de LPS diluido en tampón GS (glicina 1M, NaCl 1.7M, pH 9.2) a una concentración final de 1 µg/mL, se selló e incubó a 37 °C por 3 horas en cámara húmeda. Luego se colocó la placa a 4 °C por toda la noche.

La placa se lavó 5 veces con solución de lavado (NaCl 0.15M, Tween20 0.01% v/v) en un lavador de placas ELISA marca BioTek ELx50. Se colocaron 25 µL por pocillo de los sueros a investigar diluidos 1/50 en tampón GS-EDTA-Tw80 (tampón GS 100 mL, EDTA 50 mM, Tween80 0.1% v/v, pH 9.2). Inmediatamente después se colocó 25 µL por pocillo del anticuerpo monoclonal 7F9 diluido 1/160 en tampón GS-EDTA-Tw80. La placa se selló y se puso en agitación durante 15 min. Después se incubó la placa a temperatura ambiente por 45 min.

Se volvió a lavar la placa y se colocaron 50 µL por pocillo de conjugado HRP IgG anti-ratón (Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibodies) del kit comercial

SVANOVIR® Brucella-Ab C-ELISA. El conjugado se diluyó 1/2 en agua destilada. La placa se incubó a temperatura ambiente por 1 h en oscuridad.

La solución de sustrato (tampón de revelación 25 mL, oPD 1 tableta, Perhydrol® 5 µL) se añadió después de haber lavado 5 veces la placa. La solución de revelación fue preparada con 1 tableta de tampón fosfato citrato en 100 mL de agua destilada. Se colocó 100 µL de la solución de sustrato y se incubó la placa a temperatura ambiente por 20 minutos en oscuridad.

La reacción se detuvo al agregar 25 µL de solución de parada (H_2SO_4 2M). Las densidades ópticas fueron leídas en el espectrofotómetro BioTek ELx800, a 490-630nm.

La selección del anticuerpo monoclonal con mejor actividad se realizó mediante 8 diluciones de cada anticuerpo monoclonal (7F9: 1/40, 1/80, 1/160, 1/20, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120; 12B12: 1/500, 1/2000, 1/8000, 1/32000, 1/100000, 1/128000, 1/200000, 1/400000) enfrentándolos con LPS y 5 sueros diferentes, dos positivos y tres negativos, diluidos 1/50. La dilución óptima de conjugado se obtuvo mediante 3 diferentes concentraciones del conjugado HRP (1, 1/2, 1/4), enfrentándolo por duplicado con dos sueros estándares, diluidos 1/50, y 8 diluciones de los dos anticuerpos monoclonales 7F9 y 12B12 (1/40, 1/80, 1/160, 1/20, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120).

El punto de corte se estableció mediante las curvas ROC usando el paquete de código abierto para R: pROC (Robin et al., 2011), empleando las densidades ópticas de 20 sueros entre positivos y negativos. En cada placa de ELISA para el análisis de los sueros a investigar se colocaron un suero positivo y un suero negativo a manera de controles, así como controles de reactivos donde se incluyó al tampón GS-EDTA-Tw80 como blanco.

3.3 Análisis estadístico

3.3.1 Diseño estadístico

La optimización de la prueba ELISA competitiva tuvo un diseño experimental descriptivo sin aplicar ningún tratamiento. Se estableció un punto de corte para cada una de las pruebas cELISA que se realizaron, para lo cual se estandarizó los tiempos de lavados, tiempos de

incubación, y principalmente las concentraciones de antígeno, suero, conjugado y anticuerpo monoclonal.

Para validar los parámetros estandarizados se determinaron características como sensibilidad, especificidad y valores predictivos (Tabla 7), además de la repetibilidad y reproductividad de la prueba diagnóstica.

3.3.2 Sensibilidad

Se refiere a la probabilidad de que un individuo enfermo arroje un resultado positivo en la prueba de diagnóstico, es decir, es la capacidad de la prueba de detectar la enfermedad. Se la determina mediante la siguiente fórmula, donde VP corresponde al verdadero positivo y FN corresponde al falso negativo:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

El valor de la sensibilidad se expresa en porcentaje y varían desde 0 a 100. Si el valor obtenido es alto, significa que la prueba diagnóstica tiene la capacidad de detectar a los individuos enfermos (Pita Fernández & Pértegas-Díaz, 2003).

Tabla 7

Estimación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos calculadas a partir de resultados de muestras procedentes de una población que se conoce que están enfermos o sanos

		Muestras de referencia		
		Muestras que se saben que son positivas	Muestras que se saben que son negativas	
Resultados de la prueba	Positivos	VP	FP	VPP VP/(VP+FP)
	Negativos	FN	VN	VPN VN/(FN+VN)
		Se VP/(VP+FN)	Sp VN/(VN+FP)	

VP: Verdadero Positivo; **FP:** Falso Positivo; **VN:** Verdadero Negativo; **FN:** Falso Negativo; **Se:** Sensibilidad diagnóstica; **Sp:** Especificidad diagnóstica; **VPP:** Valor Predictivo Positivo. **VPN:** Valor Predictivo Negativo. **Fuente:** OIE (2009).

3.3.3 Especificidad

Se refiere a la probabilidad que tiene la prueba de diagnóstico de identificar a los individuos sanos, es decir, es la capacidad de obtener de un individuo sano un resultado negativo. La especificidad se estima con la siguiente fórmula, donde VN son los verdaderos negativos y FP son los falsos positivos (Camila Medina, 2011).

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

3.3.4 Valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)

El valor predictivo positivo (VPP) hace referencia a la probabilidad de que al tener el resultado de un individuo enfermo, la prueba diagnóstica arroje un resultado positivo, el cual se estima por medio de los verdaderos positivos (VP) y falsos positivos (FP):

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

Por otro lado, el valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que al tener un resultado de un individuo sano, en la prueba diagnóstica, la prueba arroje un resultado negativo. Este valor se estima mediante los verdaderos negativos (VN) y falsos negativos (FN):

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

Estos dos valores se los expresa en porcentaje, siendo valor ideal igual a 100% (Pita Fernández & Pértegas-Díaz, 2003).

3.3.5 Repetibilidad

Se refiere a la concordancia entre los resultados cuando se realizan réplicas de una muestra. Se lo evalúa los resultados de las réplicas de una muestra en una misma placa y en otras placas al realizar la misma prueba (OIE, 2009).

Para determinar la repetibilidad de la prueba ELISA competitiva, se seleccionaron aleatoriamente sueros que presentan densidades ópticas diferentes para someterlas a la prueba de

5 repeticiones para determinar si el resultado positivo o negativo ocurre en cada una de las réplicas.

3.3.6 Reproducibilidad

La reproducibilidad permite determinar la coherencia de los resultados al ser repetido o medido varias veces por otros operarios y laboratorios (Portuondo Paisan & Portuondo Moret, 2010). La precisión de los resultados se lo realizó mediante alícuotas de las muestras que fueron analizadas en diferentes laboratorios (OIE, 2009).

Para el análisis de la reproducibilidad del ELISA competitivo se procesaron 15 muestras diferentes, con alícuotas idénticas, en el laboratorio de Biotecnología Animal.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

4.1 Muestras serológicas

Se utilizaron 56 muestras de suero sanguíneo bovino que se obtuvieron de 12 haciendas ubicadas la parroquia San Pedro de Suma, en el cantón El Carmen de la provincia de Manabí, 85 muestras de 19 haciendas ubicadas en las Isla Santa Cruz de la provincia de Galápagos, y 25 muestras donadas por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD).

Todas las muestras de suero sanguíneo fueron procesadas, obteniendo un total de 166 muestras, las mismas que fueron sometidas a las pruebas Rosa de Bengala (RB), Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA), y el Ensayo Inmunoenzimático indirecto (iELISA). De los resultados obtenidos, se seleccionaron los sueros positivos para emplearlos como controles en la prueba de ELISA competitivo (cELISA) para el establecimiento del punto de corte.

Adicionalmente, se obtuvieron muestras negativas procedentes del Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador. También se obtuvo una muestra positiva procedente de un animal al que se confirmó su infección con *B. abortus* mediante el aislamiento de la bacteria (Vaca América, C+ VAm). De estas muestras se hicieron alícuotas para emplearlos como controles en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, así como para el establecimiento del punto de corte.

Como control positivo se empleó una muestra de suero bovino procedente de Bélgica (C+ belga), mientras que como control negativo (305 San Rafael) se empleó una muestra de suero bovino procedente de la Hacienda “San Rafael” (El Carmen) donde se considera una zona libre de la enfermedad.

4.2 Prueba Rosa de Bengala (RB)

Los resultados de la prueba de Rosa de Bengala (RB) se describen en la Tabla 8. Los sueros fueron clasificados según la presencia o ausencia de aglutinación durante la prueba. En cada placa analizada, se colocó un el control negativo (C-IASA) y el control positivo (C+belga).

Tabla 8

Resultados de la prueba Rosa de Bengala aplicada a los sueros recolectados de tres escenarios diferentes

Escenario	Rosa de Bengala (RB)		Total
	Positivo (+)	Negativo (-)	
El Carmen	4 (7.69 %)	52 (92.31 %)	56
Isla Santa Cruz	0 (0 %)	85 (100 %)	85
AGROCALIDAD	5 (20 %)	20 (80 %)	25
Total	9	157	166

Positivo (+): Número de animales que presentaron aglutinación durante la prueba. **Negativo (-):** Número de animales que no presentaron aglutinación durante la prueba.

En total se obtuvo el 5.42% (9/166) de animales positivos en los tres escenarios analizados. De las 166 muestras de suero sanguíneo analizado, el 7.69% (4/56) de muestras procedentes de El Carmen presentaron aglutinación durante la prueba, mientras que el 20% (5/25) de las muestras donadas por AGROCALIDAD resultaron positivos para RB. En el caso de las muestras procedentes de la Isla Santa Cruz, se obtuvo el 0% (0/85) de muestras positivas para RB.

4.3 Prueba de seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA)

Se realizó la prueba SAT-EDTA para determinar la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp. en los sueros sanguíneos bovinos de los tres escenarios epidemiológicos. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 9.

Tabla 9

Resultados de la prueba SAT-EDTA aplicada a los sueros recolectados de tres escenarios diferentes

Escenario	SAT-EDTA		Total
	Positivo (+)	Negativo (-)	
El Carmen	7 (12.5%)	49 (87.5%)	56
Isla Santa Cruz	0 (0%)	85 (100%)	85
AGROCALIDAD	8 (32%)	17 (68%)	25
Total	15	151	166

Positivo (+): Número de animales que presentaron aglutinación. **Negativo (-):** Número de animales que no presentaron aglutinación.

En total se obtuvo el 9.04% (15/166) de animales positivos en los tres escenarios analizados. De las 166 muestras de suero sanguíneo analizado, el 12.5% (7/56) de muestras procedentes de El Carmen presentaron aglutinación, mientras que el 32% (8/25) de las muestras donadas por AGROCALIDAD resultaron positivas para SAT-EDTA. En el caso de las muestras procedentes de la Isla Santa Cruz, se obtuvo el 0% (0/85) de muestras que presentaron aglutinación.

Los resultados de la prueba SAT-EDTA fueron expresados en Unidades Internacionales de aglutinación (UI) por lo que se realizó la titulación de los sueros, determinando el porcentaje de aglutinación de cada muestra según el grado de translucidez y la dilución del suero. Se expresó las UI de los sueros según la última dilución en que se presentó aglutinación, tal como se describe en la Tabla 6. Las UI de las muestras que dieron positivas para la prueba SAT-EDTA están detalladas en la Tabla 10.

4.4 Correlación entre los resultados de RB y SAT-EDTA

La correlación de los resultados de las pruebas RB y SAT-EDTA se determinó para las muestras pertenecientes al cantón El Carmen y a AGROCALIDAD. Los resultados de las muestras pertenecientes a la Isla Santa Cruz, Galápagos no presentaron diferencias entre las dos pruebas realizadas por la ausencia de resultados positivos, por lo que no se sometió al análisis de correlación.

Tabla 10

Resultados de la prueba SAT-EDTA titulación expresados en Unidades Internacionales de las muestras consideradas positivas.

Escenario	Muestra	Dilución	UI/mL
El Carmen	SB006	1/400	480
	SB010	1/200	400
	SB044	1/25	50
	SB100	1/50	100
AGROCALIDAD	8865	1/800	1600
	8985	1/25	40
	8989	1/25	40
	9021	1/25	40
	9049	1/25	40
	9564	1/25	40
	9571	1/25	30
	12290	1/200	400

UI: Unidades Internacionales de aglutinación. **Valor a partir del que se considera a un bovino positivo para brucelosis (cut-off):** 30 UI/mL.

Tabla 11

Correlación de los resultados de las pruebas RB y SAT-EDTA aplicadas en las muestras del cantón El Carmen

RB	SAT-EDTA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4	0	4
Negativo	1	51	52
Total	5	51	56

RB: Rosa de Bengala. **SAT-EDTA:** Prueba de Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA.

De los 56 sueros sanguíneos pertenecientes al cantón El Carmen, cuatro muestras fueron positivas para las pruebas RB y SAT-EDTA, y solamente una muestra fue positivo para la prueba SAT-EDTA pero negativa para la prueba RB (Tabla 11). La correlación para las muestras del cantón El Carmen fue de 98.21% (Kappa=0.8792; p<0.05).

Tabla 12

Correlación de los resultados de las pruebas RB y SAT-EDTA aplicadas en las muestras de AGROCALIDAD

RB	SAT-EDTA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	0	5
Negativo	3	17	20
Total	8	17	25

RB: Rosa de Bengala. **SAT-EDTA:** Prueba de Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA.

En el caso de las muestras pertenecientes a AGROCALIDAD, de los 8 sueros positivos para la prueba SAT-EDTA, sólo cinco sueros dieron positivo para la prueba RB (Tabla 12). La correlación para las muestras de AGROCALIDAD fue de 88% (Kappa=0.694; $p < 0.05$).

4.5 Resultados de la optimización del iELISA

4.5.1 Determinación de la solución de bloqueo

Se diseñó un ensayo en el que se emplearon dos tipos diferentes de solución de bloqueo: Colágeno Hidrolizado (Colnatur[®]) y Leche de Soya (Oriental[®]). Las soluciones fueron preparadas al 5% de concentración en PBS 0.02 M, pH 7.2.

Las placas fueron sensibilizadas con LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C por cuatro horas y luego a 4 °C por toda la noche. Se colocaron las soluciones de bloqueo, cinco sueros diluidos (1/50), la solución de conjugado diluidos (1/25000) y el sustrato o-fenilenodiamina (oPD).

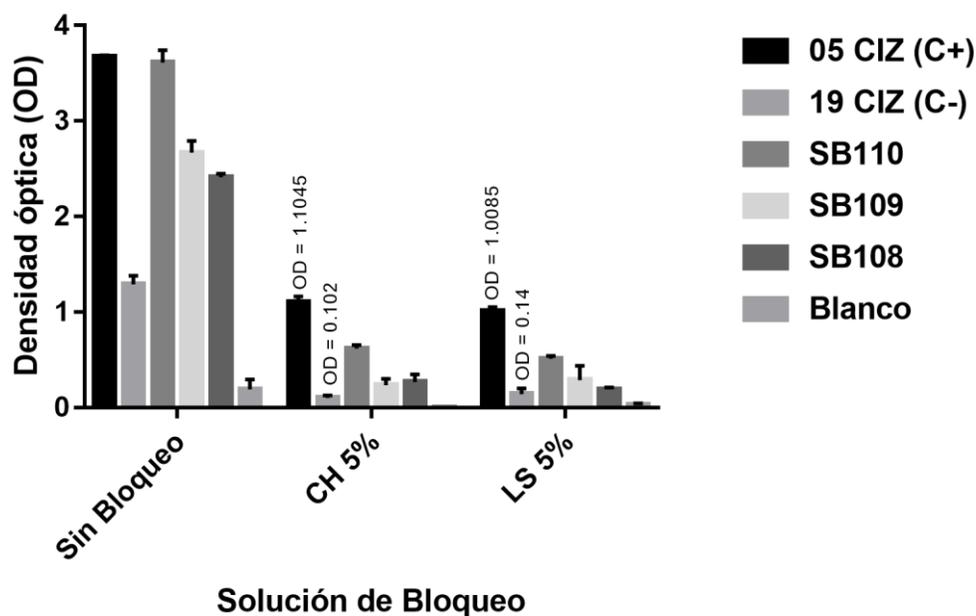


Figura 10. Densidad óptica del ELISA de 5 sueros tratados con diferentes soluciones de bloqueo al 5%. CH: Colágeno Hidrolizado. LS: Leche de Soya.

Al analizar los resultados obtenidos, el tratamiento sin solución de bloqueo presentó los valores más altos de densidad óptica (OD) entre los sueros empleados (Figura 10). La solución de bloqueo con leche de soya al 5% (LS 5%) presentó los valores más bajos de OD de los sueros empleados, pero la solución de bloqueo con colágeno hidrolizado al 5% presentó una mayor diferencia entre el control positivo (OD=1.1045) y el control negativo (OD=0.102) por lo que se determinó como el mejor agente de bloqueo y fue utilizado en las siguientes pruebas.

4.5.2 Determinación de la dilución de conjugado G-HRPO

Se realizó un ensayo con varias diluciones de conjugado G-HRPO (1/25000, 1/37500, 1/50000, 1/62500) enfrentados a cinco sueros diluidos (1/50). Primero se sensibilizó la placa con LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37 °C por cuatro horas y a 4 °C por toda la noche, luego se colocó la solución de bloqueo (colágeno hidrolizado al 5%), las cuatro diluciones del conjugado G-HRPO y el sustrato *o*PD.

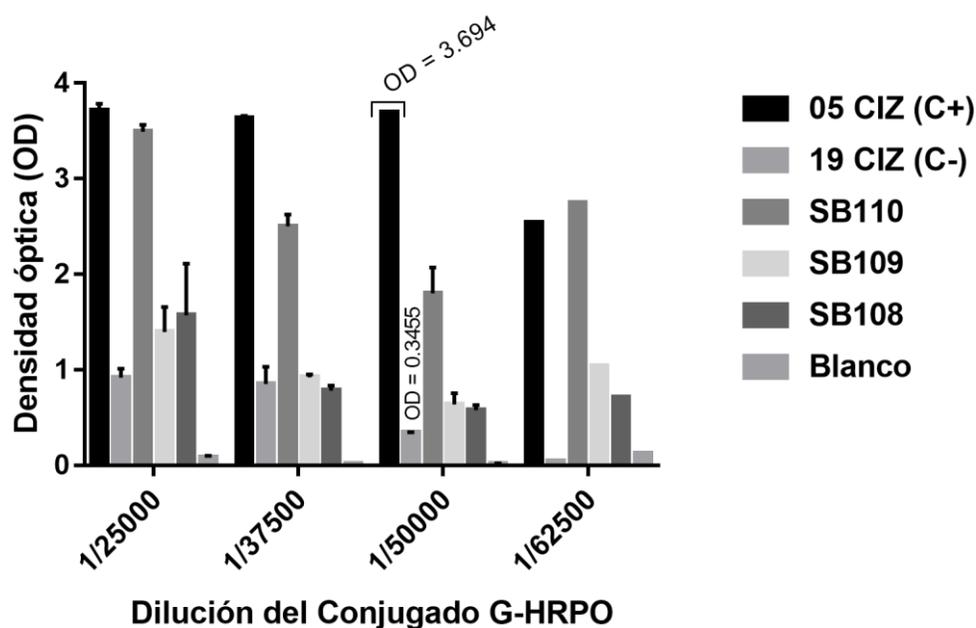


Figura 11. Densidades ópticas (OD) de cinco sueros diluidos 1/50 enfrentados a cuatro diluciones de conjugado G-HRPO (1/25000, 1/37500, 1/50000, 1/62500).

Los resultados que se obtuvieron de los cinco sueros se representan en la *Figura 11*. La dilución del conjugado (1/25000) presentó los valores más altos de OD entre los sueros. La dilución del conjugado (1/62500) presenta los valores más bajos de OD, siendo el suero control negativo el valor más bajo (OD = 0.045) comparado con el blanco (OD = 0.126), lo que indica que se requirió más conjugado para reaccionar con el suero.

Las diluciones de conjugado (1/37500) y (1/50000) presentaron valores de OD similares para el suero control positivo, pero al comparar los valores correspondientes al control negativo, la dilución (1/50000) presentó el valor de OD más bajo. Por lo tanto, la dilución del conjugado 1/50000 se seleccionó para los siguientes ensayos debido a que permitió la mayor diferencia entre el suero control positivo y el suero control negativo.

4.5.3 Determinación de la concentración óptima de lipopolisacárido (LPS) como antígeno y la concentración óptima de la solución de bloqueo

Se evaluaron cinco concentraciones de antígeno LPS (1/10, 1/25, 1/50, 1/75, 1/100) y a tres concentraciones de colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) como agente de bloqueo frente a

una dilución estándar 1/50 de tres sueros clasificados como dos positivos y uno negativo. El ensayo se realizó con una dilución de conjugado G-HRPO (1/50000).

En las *Figura 12* se representó las diferentes densidades ópticas que se obtuvo de los sueros positivos y negativos. En la *Figura 12 A* y *B*, se observó que el suero control negativo presentó una disminución en el valor de la densidad óptica (OD) conforme se aumenta la concentración de colágeno hidrolizado. A partir de la dilución de LPS 1/50 (*Figura 12 C*), los valores de OD del suero control negativo aumentaron y disminuyeron a medida que se aumentó la concentración de colágeno hidrolizado y disminuyó la concentración de LPS, siendo el valor de OD más alto obtenido el de 0.697 a una concentración de colágeno hidrolizado de 5% y una dilución de LPS de 1/75 (*Figura 12***Error! Reference source not found. D**).

En el caso de los sueros positivos, los valores de OD fueron disminuyendo o aumentando según la cantidad de colágeno hidrolizado y LPS presentes, alcanzando un valor máximo de 3.733 (colágeno hidrolizado al 10% y LPS a 1/10) y un valor mínimo de 2.338 (colágeno hidrolizado al 7.5% y LPS a 1/50), correspondientes al suero positivo C+ belga. El blanco permaneció con valores de OD menores a 0.05 en todos los tratamientos.

La mayor diferencia entre los sueros controles positivos y el suero control negativo se observaron en la *Figura 12 A* y *C*, para la condición de dilución de LPS (1/10 y 1/50) y colágeno hidrolizado (5% y 7.5%). Para seleccionar el mejor de estos resultados se determinó el cociente entre el promedio de los OD de los sueros controles positivos y el valor de OD del suero control negativo, donde se obtuvo el valor de 9.30 para la dilución de LPS (1/10) y colágeno hidrolizado al 5%, y 9.20 para la dilución de LPS (1/50) y colágeno hidrolizado al 7.5%.

La condición que presentó una mayor diferencia fue para la dilución de LPS (1/10) y colágeno hidrolizado al 5%, pero para optimizar la cantidad de antígeno y evitar saturación (4 unidades de OD), se escogió la dilución 1/50 de LPS y la concentración 7.5% de colágeno como las condiciones óptimas para el iELISA (Tabla 13).

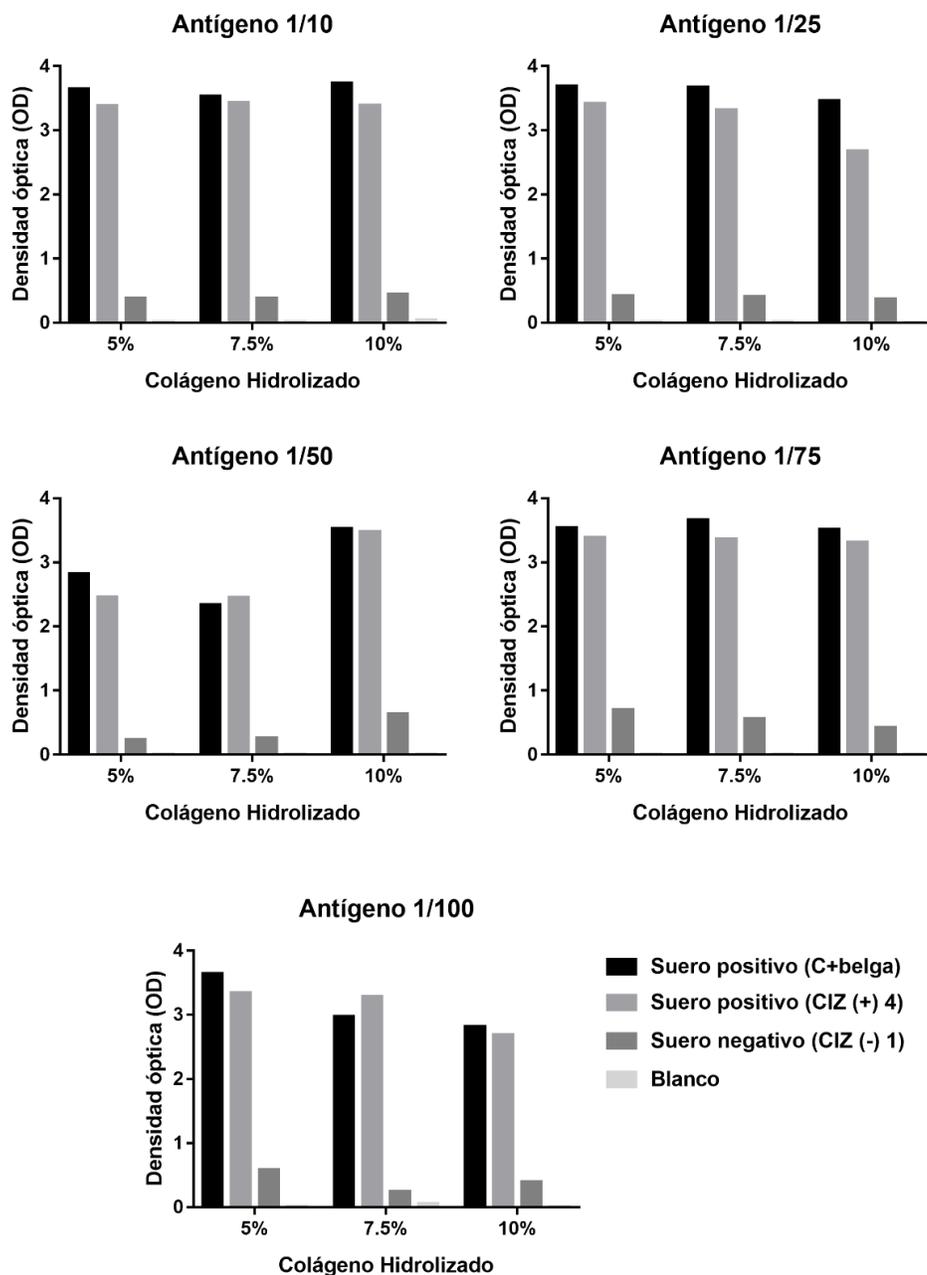


Figura 12. Densidades ópticas del ELISA de dos sueros positivos y uno negativo diluidos 1/50, enfrentados a cinco concentraciones del antígeno LPS y tres concentraciones de colágeno hidrolizado. A: Antígeno 1/10, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. B: Antígeno 1/25, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. C: Antígeno 1/50, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. D: Antígeno 1/75, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50. E: Antígeno 1/100, colágeno hidrolizado (5%, 7.5%, 10%) y 3 sueros diluidos 1/50.

Tabla 13*Condiciones óptimas del ELISA indirecto para el diagnóstico de brucelosis bovina*

Paso del ELISA	Descripción	Concentración	µL/pocillo	Tiempo de incubación
Antígeno LPS	Diluido en tampón Glicina 10X, pH 9.2 ±0.1	0.2 µg/mL	100	3 h 50 min a 37 °C, luego a 4 °C por toda la noche
Lavado*	NaCl 0.15 M, Tween 20 0.01%	-	300	-
Bloqueo con colágeno hidrolizado	Diluido en PBS 0.02 M, pH 7.2	7.5%	200	37 °C por una hora
Lavado	NaCl 0.15 M, Tween 20 0.01%	-	300	-
Suero	Diluido en tampón Glicina-EDTA-Tween 80	1/50	50	Temperatura ambiente por una hora
Lavado	NaCl 0.15 M, Tween 20 0.01%	-	300	-
Conjugado G-HRPO	Diluido en tampón G-HRPO; SFB 2% (v/v)	1/50000	50	Temperatura ambiente por una hora y en oscuridad
Lavado	NaCl 0.15 M Tween 20 0.01%	-	300	-
Sustrato	Tampón Fosfato Citrato 25 mL oPD 1 tableta (10 mg) + H ₂ O ₂ 5 µL	-	100	Temperatura ambiente por 20 min en oscuridad
Detener la reacción	H ₂ SO ₄ 2 M	-	25	-
Lectura**	490-630 nm	-	-	-

*Lavado en el equipo BioTek ELx50, ajustado para lavar 5 veces cada placa. **Lectura en el equipo BioTek ELx800. **G-HRPO:** Proteína G conjugada a *Horseradish Peroxidase*. **LPS:** Lipopolisacárido.

4.5.4 Determinación del punto de corte

El punto de corte se estableció mediante diluciones seriadas del control positivo en una solución de control negativo, tal como lo describe Ron-Román (2003). La curva de calibración se conformó de seis diluciones del suero control positivo (1/270, 1/540, 1/1080, 1/2160, 1/4320, 1/8640), tampón para diluir la curva de calibración (BS) y tampón para diluir los sueros (BB). Para la interpretación de los resultados, se utilizó la relación entre las diluciones de la curva de calibración y las Unidades (Tabla 14).

Tabla 14

Relación entre las diluciones de la curva de calibración y las Unidades (U)

Diluciones de la curva de calibración	Unidades (U)
1/270	60
1/540	30
1/1080	15
1/2160	7.5
1/4320	3.75
1/8640	1.87

Punto de corte (Cut-off) en bovinos: >1.87 U. **Fuente:** Ron-Román (2003).

Se realizó un ensayo donde se usaron cinco sueros positivos, cinco sueros negativos, un suero control positivo y un suero control negativo, y se emplearon las condiciones óptimas establecidas para la técnica del iELISA.

Los valores de OD de cada muestra fueron corregidos al restar el valor de OD obtenido en BB. En la Tabla 15 se detalló los valores de OD de las diluciones de la curva de calibración y de las muestras analizadas, junto con los valores de OD corregidos, unidades y resultado.

Se comprobó que la curva de calibración cumpla con los siguientes parámetros de control:

- Dilución (**1/270**) debe ser mayor a 2 unidades de OD.
- **BS** debe alcanzar un valor máximo de 0.3 unidades de OD.
- **BB** debe alcanzar un valor máximo de 0.05 unidades de OD.

Tabla 15

Densidades ópticas, unidades y resultado de las muestras analizadas con el iELISA

	Muestra/Dilución	OD	OD corregido	Unidades	Resultado
Curva de calibración	1/270	2.452	2.4475	60	-
	1/540	1.72	1.7155	30	-
	1/1080	1.2655	1.261	15	-
	1/2160	0.834	0.8295	7.5	-
	1/4320	0.6765	0.672	3.75	-
	1/8640 (Cut-off)	0.288	0.2835	1.87	-
	BS	0.0415	0.037	-	-
	BB	0.0045	0	-	-
Suero controles	(-) 1	0.0595	0.055	0	Negativo
	(+) 1	0.4881	0.48360	1.87	Positivo
	C+ belga	2.722	2.7175	60	Positivo
	C- (CIZ)	0.0765	0.072	0	Negativo

BS: Tampón para diluir la curva de calibración. **BB:** Tampón para diluir los sueros. **OD del punto de corte (Cut-off):** 0.2835.

Al cumplir con los parámetros de control, el valor de OD obtenido para el punto de corte, es decir para la dilución (1/8640), fue de 0.2835. Los valores de OD que fueron mayores a este punto se consideraron positivos, mientras que si los valores estuvieron por debajo de este punto se consideraron negativos. Las unidades en las muestras se colocaron según al valor de OD de la curva de calibración al cual es superior.

La curva de calibración se colocó en cada placa para obtener el punto de corte específico, ajustándolo a las variaciones que pueden existir por la preparación de reactivos, uso de los sueros controles para la elaboración de la curva de calibración y errores de manipulación en cada ensayo.

4.5.5 Repetibilidad y reproducibilidad del iELISA

La repetibilidad se determinó mediante un ensayo donde se utilizaron cinco alícuotas de un suero control negativo (CIZ -1, 2, 3, 4, 5), cinco alícuotas de un suero control positivo (C+ VAm 1, 2, 3, 4, 5), el suero control positivo (C+ belga) y el suero negativo (305 San Rafael).

Se realizaron dos ensayos en diferentes días, utilizando las condiciones óptimas establecidas para el iELISA. Los resultados fueron procesados y se aplicó la fórmula del coeficiente de variación ($CV = DE/\bar{X} \times 100$), donde DE es la desviación estándar y \bar{X} es el promedio de los datos. Se obtuvieron los porcentajes de 4.24%, 26.24%, 6.54% y 6.67% correspondientes a las muestras CIZ (-), C+ VAm, C+ belga y 305 San Rafael, respectivamente. En promedio se obtuvo un coeficiente de variación de 10.92%.

Para la reproducibilidad, se procesaron 15 muestras (7 sueros positivos y 6 sueros negativos), el suero control positivo (C+ belga) y el suero negativo (158 Galápagos). Las muestras se analizaron en un mismo ensayo con las condiciones óptimas establecidas para el iELISA y fue realizado por dos operarios diferentes.

El índice kappa entre operadores fue de 0.71 ($p < 0.05$), con un coeficiente de variación intraclase (ICC) de 55.6%. Se presentaron dos casos discordantes donde dos sueros negativos resultaron positivos para uno de los operadores. El coeficiente de variación de los sueros controles entre los dos operadores fue de 24.24% en el suero control positivo (C+ belga) y 37.95% en el suero control negativo (158 Galápagos).

4.5.6 Resultados del iELISA aplicado a bovinos en tres escenarios epidemiológicos

Se analizó las 166 muestras de sueros bovinos siguiendo las condiciones óptimas establecidas para la prueba iELISA para realizar el diagnóstico de brucelosis bovina.

Tabla 16

Seroprevalencia de Brucella spp., mediante la prueba ELISA indirecto en bovinos procedentes del cantón El Carmen (Manabí), Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD

Escenario	Número de animales	Sueros positivos	Sueros negativos	Prevalencia
San Pedro de Suma, El Carmen	56	7	49	12.5%
Santa Cruz, Galápagos	85	0	85	0%
AGROCALIDAD	25	5	20	20%
Total	166	12	154	7.23%

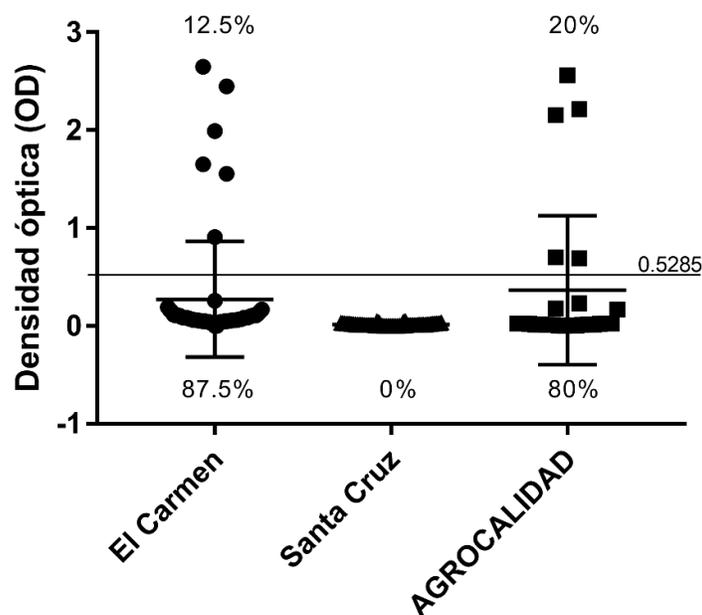


Figura 13. Seroprevalencia de brucelosis bovina en muestras procedentes del cantón El Carmen (Manabí), la Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD

En la Tabla 16 se detalla los resultados serológicos de los tres escenarios epidemiológicos analizados. Se obtuvo una prevalencia total de 7.23% (12/166) para brucelosis bovina en los tres escenarios epidemiológicos. Para cada escenario se determinó la prevalencia (*Figura 13*), siendo para el cantón El Carmen de 12.5% (7/56), para la Isla Santa Cruz de 0% (0/85) y para AGROCALIDAD de 20% (5/25).

4.6 Resultados cELISA

4.6.1 Selección del anticuerpo monoclonal

Se realizó un ELISA donde se probaron los dos anticuerpos monoclonales (7F9 y 12B12) conjugados a la peroxidasa HRP, para determinar el que presenta una mejor reacción. De cada anticuerpo monoclonal se realizaron diluciones diferentes en base a la dilución recomendada en el protocolo (Com. Pers. Ron-Román J. 2017), para enfrentarlos a una concentración de LPS (1 µg/mL) y a sueros problemas diluidos (1/50).

En el primer ensayo, se sensibilizó una placa con LPS, se colocaron las diferentes diluciones de los anticuerpos monoclonales, se añadió el sustrato *o*PD y la solución de parado.

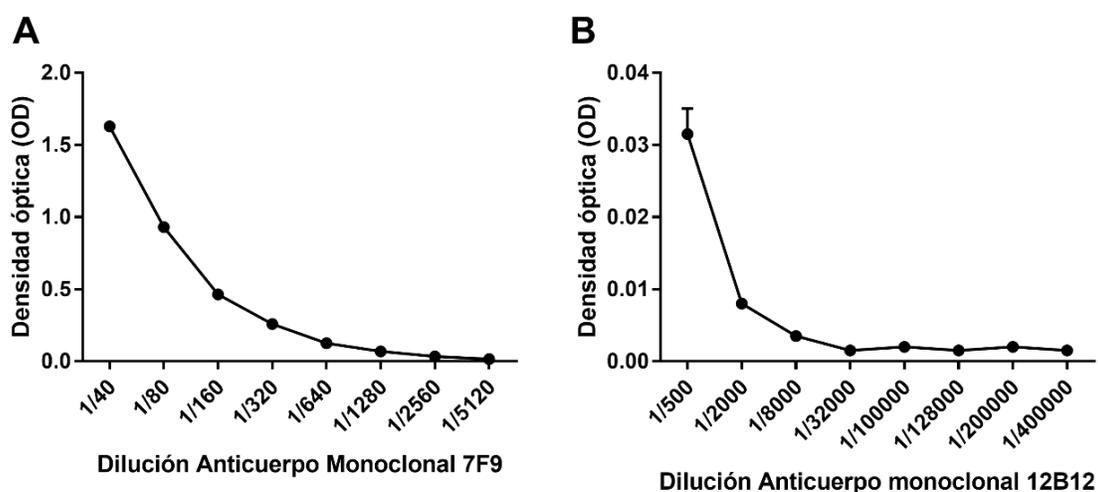


Figura 14. Diluciones de los anticuerpos monoclonales A: 7F9 y B: 12B12, enfrentados a una concentración del antígeno LPS de (1 μ g/mL)

El anticuerpo monoclonal 7F9 fue el que presentó mayor reactividad frente al antígeno LPS, presentando valores mayores a 1.5 unidades de densidad óptica a una dilución de (1/40). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal 12B12 presentó valores menores a 0.04 a medida que aumentaba la dilución (*Figura 14*), por lo que se probaron nuevas diluciones, las mismas empleadas para el anticuerpo monoclonal 7F9.

Las densidades ópticas obtenidas con las nuevas diluciones del anticuerpo monoclonal 12B12, en presencia de LPS, resultaron menores que los obtenidos con el anticuerpo monoclonal 7F9 (*Figura 15*), es decir, resultó menos reactivo frente al antígeno LPS, por lo que se lo descartó para los siguientes ensayos.

En el segundo ensayo, se emplearon las mismas diluciones del anticuerpo monoclonal 7F9 (1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120) para enfrentarlas a dos sueros positivos (C+ Belga, V. América) y a tres sueros negativos (305 El Carmen, 501 Salinas, CIZ) diluidos (1/50).

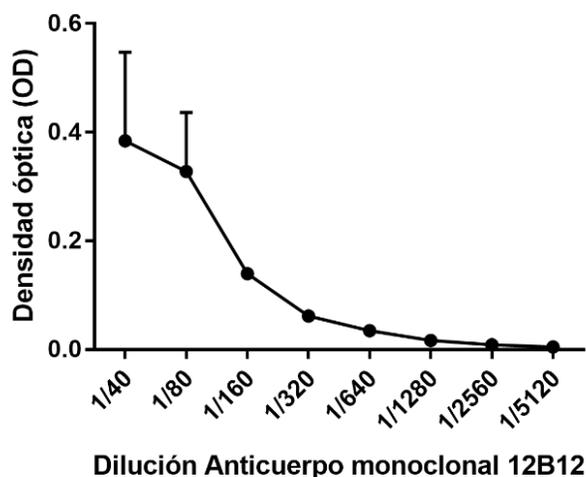


Figura 15. Diluciones del anticuerpo monoclonal 12B12 enfrentados a una concentración del antígeno LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)

Se observaron densidades ópticas menores de las que se obtuvo con las mismas diluciones del anticuerpo monoclonal 7F9 sin la presencia de sueros, manteniéndose en un rango de 0.4 a 0.8 unidades de OD (*Figura 16*). A pesar de ello, no se observó una gran diferencia entre los sueros positivos y los sueros negativos, por lo que se probaron añadir el conjugado HRP IgG anti ratón de un kit comercial para mejorar el diagnóstico.

4.6.2 Determinación de la dilución óptima del anticuerpo monoclonal frente a diferentes diluciones del conjugado HRP IgG anti-ratón

Se diseñó un ensayo en donde se evaluaron los diferentes anticuerpos monoclonales: 7F9 y 12B12. Se prepararon varias diluciones para cada anticuerpo monoclonal, las que se enfrentaron a tres diluciones del conjugado HRP IgG anti-ratón de un kit de cELISA comercial (puro, 1/2, 1/4) por duplicado. En este ensayo no se emplearon sueros controles.

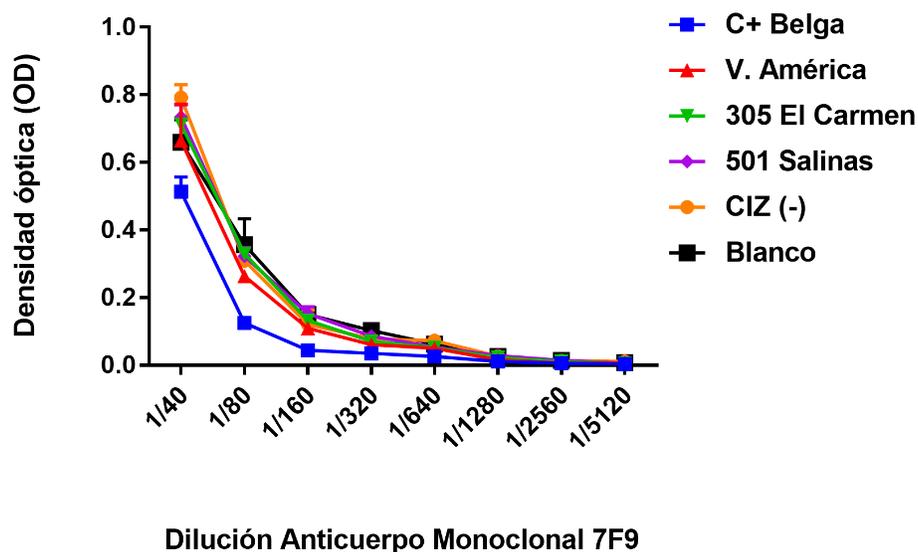


Figura 16. Diluciones del anticuerpo monoclonal 7F9, enfrentados a dos sueros positivos y tres sueros negativos diluidos (1/50)

La placa fue sensibilizada con LPS a una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$, luego se colocaron las diferentes diluciones de los anticuerpos monoclonales (1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120), el conjugado HRP IgG anti-ratón (puro, 1/2, 1/4) y el sustrato oPD.

En la *Figura 17* se representa las diferentes densidades ópticas entre las diluciones de cada anticuerpo monoclonal y el conjugado HRP IgG anti-ratón. Se observó que los valores de OD estaban fuertemente afectados por la dilución del anticuerpo monoclonal y la dilución del conjugado, disminuyendo su valor conforme mayor es la dilución de cualquiera de los dos anticuerpos monoclonales y del conjugado, siendo el tratamiento con anticuerpo monoclonal 7F9 y conjugado HRP IgG anti-ratón puro el que presentó los valores de OD más altos.

Al comparar los valores de OD que presentaron las diferentes diluciones de los dos anticuerpos monoclonales, el anticuerpo monoclonal 7F9 fue el que presentó una mayor reactividad con cualquiera de las tres diluciones del conjugado, por lo que se escogió al anticuerpo monoclonal 7F9 para los siguientes ensayos.

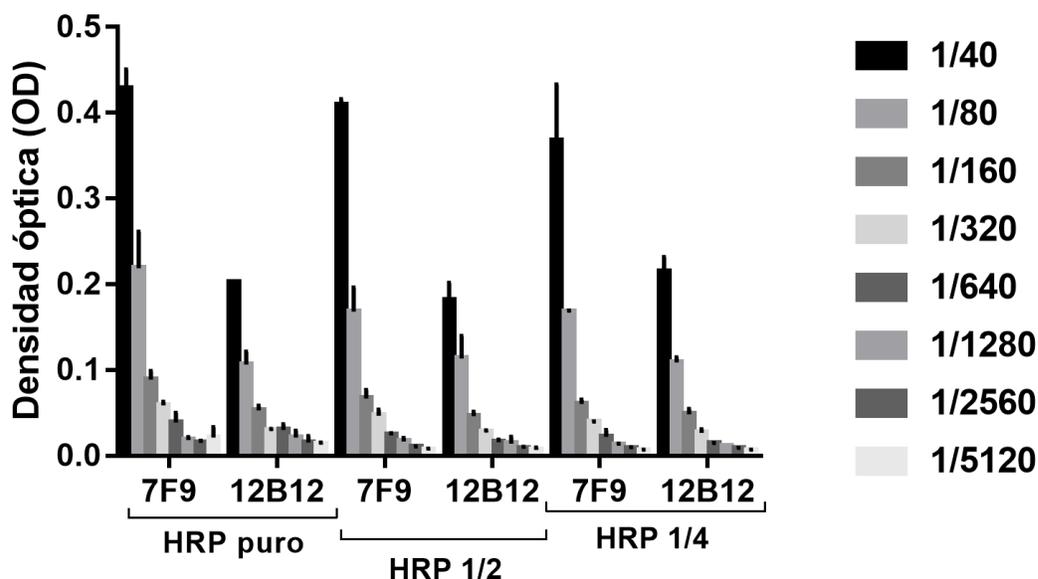


Figura 17. Densidades ópticas (OD) de ocho diluciones de cada anticuerpo monoclonal: 7F9 Y 12B12 (1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2580, 1/5120) frente a tres diluciones de conjugado HRP anti-ratón (puro, 1/2, 1/4). HRP: Horseradish peroxidase.

4.6.3 Determinación de la dilución óptima del anticuerpo monoclonal y del conjugado HRP IgG anti-ratón frente a sueros controles

Se elaboró un ensayo donde se evaluó varias diluciones de cada anticuerpo monoclonal junto con tres diluciones del conjugado HRP IgG anti-ratón (puro, 1/2, 1/4), enfrentados a un suero control positivo y un suero control negativo diluidos (1/50).

La *Figura 18* se representa las diferencias de densidades ópticas entre el suero control positivo y el suero control negativo de cada tratamiento evaluado. Al comparar entre los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal 7F9 y 12B12, se observó que el anticuerpo monoclonal 12B12 fue el que presentó los valores más bajos de densidad óptica en cualquiera de las tres diluciones del conjugado analizadas, por lo que se lo descartó para los próximos ensayos.

En la *Figura 18* A, C y E, se observó que tanto el suero control positivo y el suero control negativo presentaron una disminución en el valor de densidad óptica conforme se aumenta la dilución del anticuerpo monoclonal 7F9 y la dilución del conjugado HRP. Las mayores diferencias entre los controles se observaron con las diluciones (1/40), (1/80), (1/160) y (1/320)

del anticuerpo monoclonal 7F9, en las tres diluciones del conjugado HRP. A partir de la dilución (1/640), los valores no permitieron diferenciar entre los sueros control positivo y negativo.

Debido a que no se presentó una diferencia significativa entre las cuatros diluciones del anticuerpo monoclonal junto con las tres diluciones del conjugado HRP, y con el objetivo de optimizar la cantidad de reactivos, se escogió a la dilución (1/320) del anticuerpo monoclonal junto con la dilución (1/2) del conjugado HRP como las condiciones óptimas del cELISA (Tabla 17).

4.6.4 Selección de sueros controles y establecimiento del punto de corte

Previo a la determinación del punto de corte del ELISA competitivo, se realizó una selección de sueros mediante tres pruebas diferentes para clasificarlos y usarlos como controles positivos o negativos.

Se emplearon 62 sueros bovinos procedentes de diferentes lugares: El Carmen (Manabí), Santo Domingo (Santo Domingo de los Tsáchilas), Salinas de Guaranda (Bolívar), CIZ, AGROCALIDAD y Bélgica. Estas muestras se seleccionaron según los resultados obtenidos en la prueba Rosa de Bengala (RB), y se aplicaron las pruebas Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA) y el ELISA indirecto optimizado.

Los resultados que se obtuvieron están detallados en la Tabla 18. De los 62 sueros, 12 muestras resultaron positivo para las tres pruebas, una muestra resultó positiva para iELISA y SAT-EDTA, una muestra fue positiva para SAT-EDTA y RB, 3 muestras positivas sólo para SAT-EDTA, 6 muestras positivas para iELISA y RB, 2 muestras positivas sólo para iELISA, una muestra positiva sólo para RB, y 36 muestras resultaron negativas para las tres pruebas.

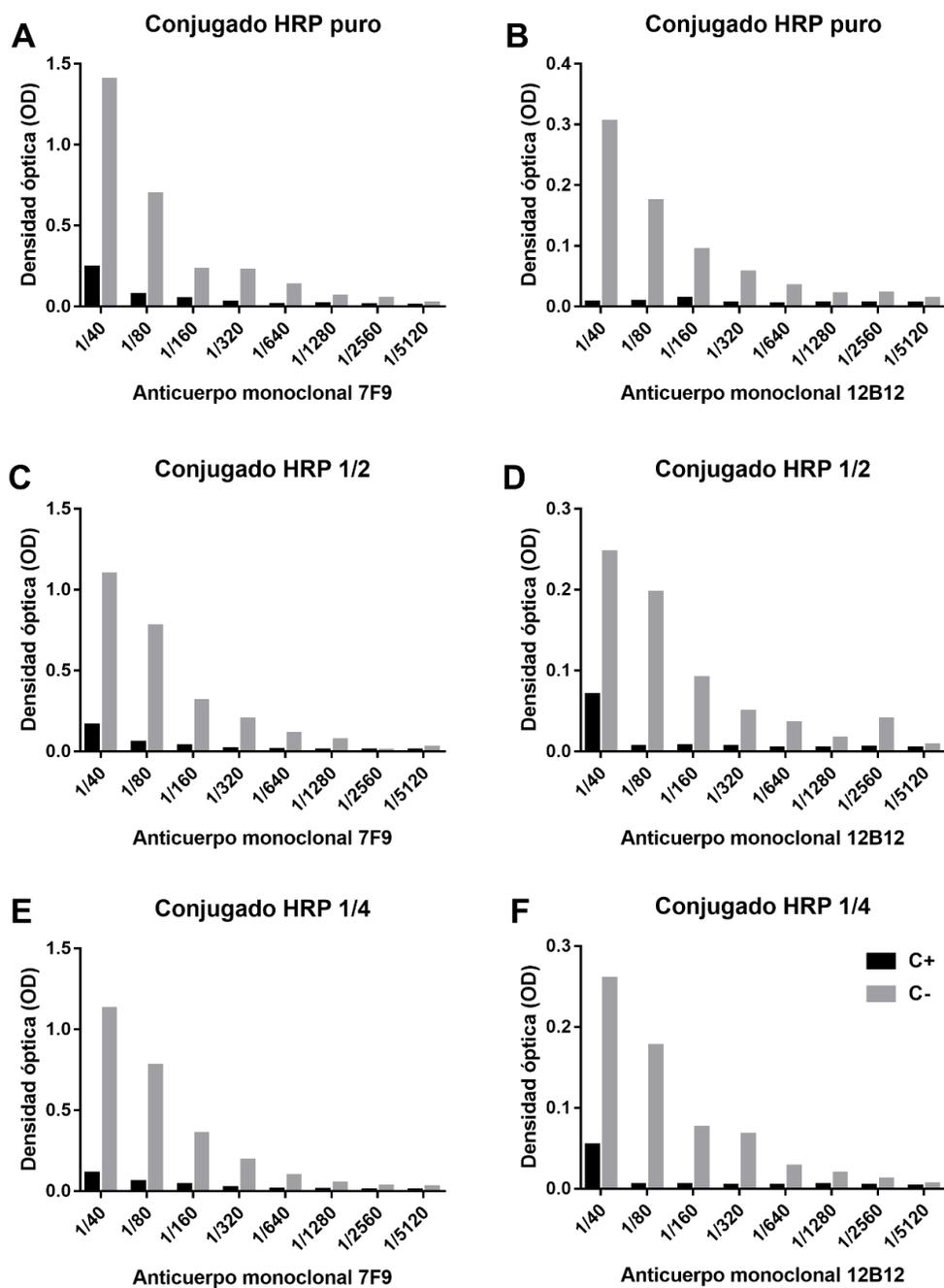


Figura 18. Gráfica de las densidades ópticas del ELISA enfrentando un suero control negativo y un suero control positivo con ocho diluciones seriadas de los anticuerpos monoclonales (7F9, 12B12) y tres diluciones de conjugado. Conjugado HRP Puro con A: Anticuerpo monoclonal 7F9 y B: Anticuerpo monoclonal 12B12. Conjugado HRP 1/2 con C: Anticuerpo monoclonal 7F9 y D: Anticuerpo monoclonal 12B12. Conjugado HRP 1/4 con E: Anticuerpo monoclonal 7F9 y F: Anticuerpo monoclonal 12B12.

Tabla 17*Condiciones óptimas del ELISA competitivo para el diagnóstico de brucelosis bovina*

Paso del ELISA	Descripción	Concentración	µL/pocillo	Tiempo de incubación
Antígeno LPS	Diluido en tampón Glicina 10X, pH 9.2 ±0.1	1 µg/mL	100	3 h a 37 °C, luego a 4 °C por toda la noche
Lavado*	NaCl 0.15 M, Tween 20 0.01%	-	300	-
Suero		1/50	25	Agitación por 15 min, luego incubar a temperatura ambiente por 45 min en oscuridad
Anticuerpo monoclonal 7F9	Diluido en tampón Glicina-EDTA-Tween 80	1/320	25	temperatura ambiente por 45 min en oscuridad
Lavado	NaCl 0.15 M, Tween 20 0.01%	-	300	-
Conjugado HRP IgG anti-ratón	Diluido en agua destilada	1/2	50	Temperatura ambiente por una hora y en oscuridad
Lavado	NaCl 0.15 M Tween 20 0.01%	-	300	-
Sustrato	Tampón Fosfato Citrato 25 mL oPD 1 tableta (10 mg) + H ₂ O ₂ 5 µL	-	100	Temperatura ambiente por 20 min en oscuridad
Detener la reacción	H ₂ SO ₄ 2 M	-	25	-
Lectura**	490-630 nm	-	-	-

*Lavado en el equipo BioTek ELx50, ajustado para lavar 5 veces cada placa. **Lectura en el equipo BioTek ELx800. **HRP:** *Horseradish Peroxidase*. **IgG:** Inmunoglobulina G. **LPS:** Lipopolisacárido.

Para el establecimiento del punto de corte, se usaron 12 sueros positivos y 36 sueros negativos, confirmados mediante las tres pruebas diagnósticas: RB, SAT-EDTA y ELISA

indirecto. Las muestras fueron analizadas con las condiciones óptimas establecidas para el ELISA competitivo.

Tabla 18

Comparación de los resultados de las muestras analizadas por tres pruebas diagnósticas diferentes: Rosa de Bengala, Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA, y ELISA indirecto

ELISA indirecto	RB	SAT-EDTA		Total
		Positivo	Negativo	
Positivo	Positivo	12	6	18
	Negativo	1	2	3
Negativo	Positivo	1	1	2
	Negativo	3	36	39
Total		17	45	62

RB: Rosa de Bengala. **SAT-EDTA:** Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA.

Las densidades ópticas se procesaron para obtener el porcentaje de inhibición de cada muestra, mediante la siguiente fórmula, donde OD es el valor de densidad óptica de la muestra/blanco, y %Inh es el porcentaje de inhibición:

$$\%Inh = 100 - \left[\frac{OD \text{ Muestra}}{OD \text{ Blanco}} \times 100 \right]$$

El punto de corte se estableció mediante porcentajes de inhibición, que fueron analizados con el paquete de código abierto para R: pROC, resultando un punto de corte del 26.88% de inhibición, con una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 83.33% (*Figura 19*).

Debido a que el punto de corte referencial puede verse alterado por la preparación de reactivos o errores en la manipulación, por lo que se colocaron 8 sueros (4 sueros negativos y 4 sueros positivos) del grupo de control en cada placa para obtener el punto de corte específico por ensayo.

Todos los porcentajes de inhibición que fueron mayores al punto de corte se consideraron como resultado positivo para brucelosis. En caso contrario, los sueros resultaron negativos para la prueba.

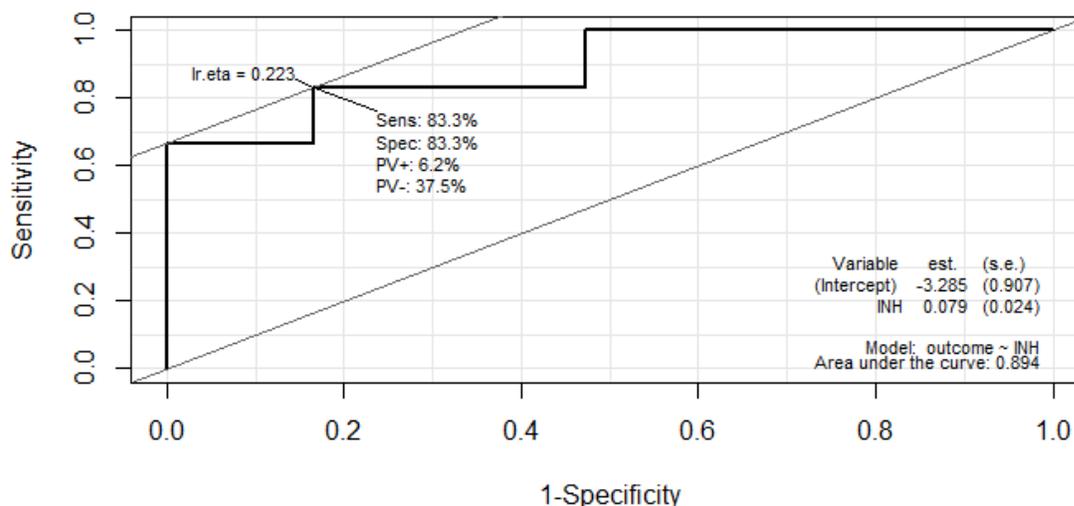


Figura 19. Establecimiento del punto de corte mediante curvas ROC, usando el paquete de código abierto pROC para R.

4.6.5 Repetibilidad y reproducibilidad del cELISA

La repetibilidad del cELISA se evaluó mediante siete alícuotas de un suero control negativo (501 Salinas) y cinco alícuotas de un suero control positivo (221 Salinas), los que fueron analizados por duplicado en el mismo ensayo. Se utilizó las condiciones óptimas establecidas para el cELISA.

Empleando la fórmula del coeficiente de variación ($CV = DE/\bar{X} \times 100$), donde DE es la desviación estándar y \bar{X} es el promedio de los datos, se obtuvieron los porcentajes de variación de las muestras: 13.09% para el suero positivo (221 Salinas) y 8.26% para el suero negativo (501 Salinas). En promedio se obtuvo un coeficiente de variación para el cELISA de 10.67%.

La reproducibilidad del cELISA se evaluó mediante el procesamiento de 22 muestras (7 sueros positivos y 15 sueros negativos), analizadas en un mismo ensayo con las condiciones óptimas establecidas, siendo realizado por dos operadores diferentes.

El índice kappa entre operadores fue de 0.727 ($p < 0.05$), y se obtuvo un coeficiente de correlación intraclase (ICC) de 83.62%. Se presentó tres casos discordantes donde un suero positivo resultó negativo y dos sueros negativos resultaron positivos para uno de los operadores.

4.6.6 Resultados del cELISA aplicado a bovinos en tres escenarios epidemiológicos

Las 166 muestras de sueros bovinos fueron analizadas mediante las condiciones óptimas del cELISA para diagnosticar animales positivos o negativos para *Brucella* spp.

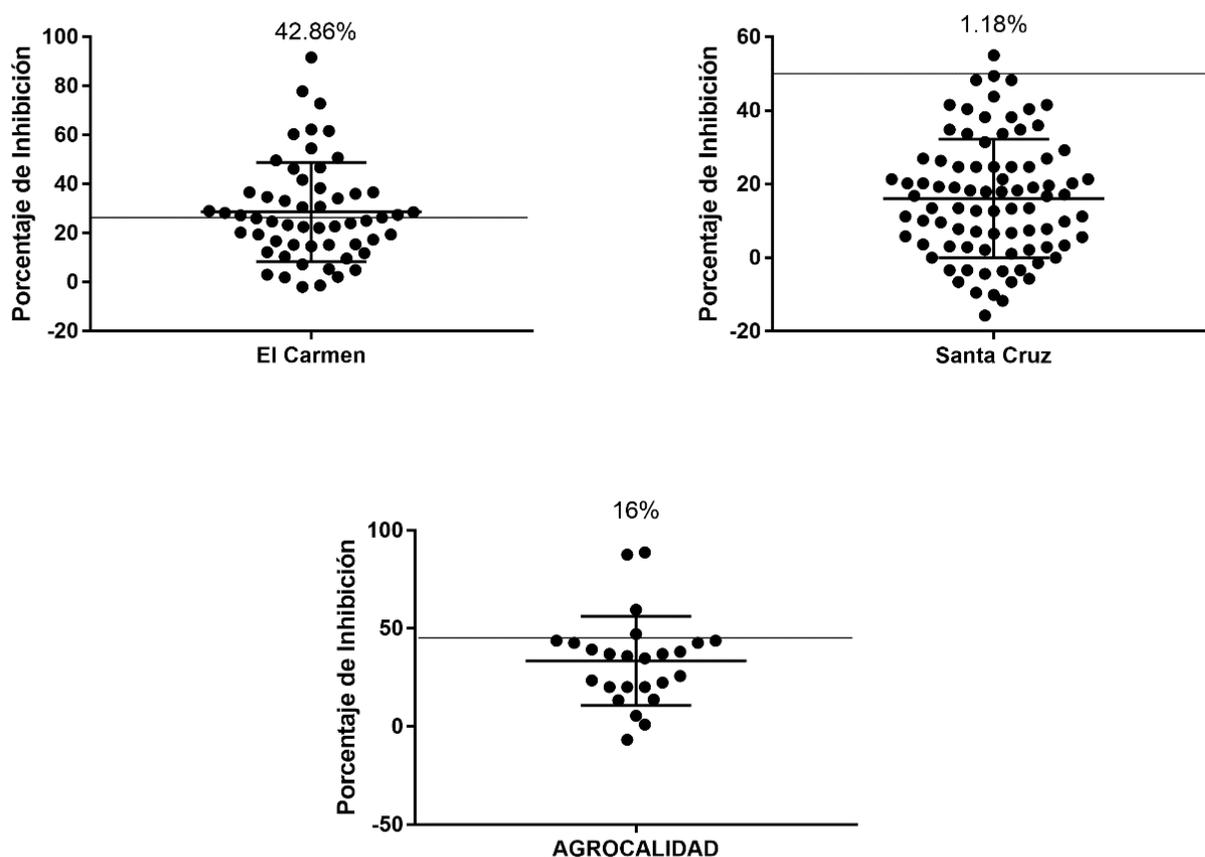


Figura 20. Seroprevalencia de brucelosis bovina en muestras procedentes del cantón El Carmen (Manabí), la Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD, con la técnica del ELISA competitivo

En la Tabla 19 se resume los resultados obtenidos de las 166 muestras procesadas. En el cantón El Carmen se obtuvo un 42.86% (24/56) de muestras positivas para *Brucella* spp., mientras que en la Isla Santa Cruz se obtuvo el 1.18% (1/84), y en las muestras de

AGROCALIDAD se observó un 16% (4/25) de animales positivos (*Figura 20*). En total se obtuvo una prevalencia del 17.47% (29/166) de animales positivos.

Tabla 19

Seroprevalencia de Brucella spp., mediante la prueba ELISA competitivo en bovinos procedentes del cantón El Carmen (Manabí), Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD

Escenario	Número de animales	Sueros positivos	Sueros negativos	Prevalencia
San Pedro de Suma, El Carmen	56	24	32	42.86%
Santa Cruz, Galápagos	85	1	84	1.18%
AGROCALIDAD	25	4	21	16%
Total	166	29	137	17.47%

%; Porcentaje.

4.7 Comparación entre los resultados de iELISA y cELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina

Se compararon los resultados obtenidos por la prueba del iELISA con los obtenidos por la prueba del cELISA, observándose que de las 166 muestras analizadas, 4.82% (8/166) sueros bovinos resultaron positivo para las dos pruebas, 2.41% (4/166) resultaron positivos sólo para el iELISA, 12.65% (21/166) resultaron positivos sólo para el cELISA, y 80.12% (133/166) resultaron negativos para las dos pruebas (Tabla 20).

Tabla 20

Comparación de los resultados obtenidos por las pruebas ELISA indirecto y ELISA competitivo, aplicadas a las muestras de tres escenarios epidemiológicos para el diagnóstico de brucelosis bovina

ELISA competitivo	ELISA indirecto		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	8 (4.82%)	21 (12.65%)	29
Negativo	4 (2.41%)	133 (80.12%)	137
Total	12	154	166

ELISA: Ensayo inmunoenzimático. %: Porcentaje.

De estos resultados, se analizó la concordancia de los datos obtenidos en cada prueba, dando un porcentaje de correlación del 84.94% (Kappa = 0.3208, $p < 0.05$).

4.8 Comparación entre los resultados de RB, SAT-EDTA, iELISA y cELISA para el diagnóstico de brucelosis bovina

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos por las pruebas RB, SAT-EDTA, iELISA con los obtenidos por la prueba del cELISA.

Tabla 21

Comparación de los resultados obtenidos por las pruebas Rosa de Bengala, Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA, ELISA indirecto y ELISA competitivo, aplicadas a las muestras de tres escenarios epidemiológicos para el diagnóstico de brucelosis bovina

RB	SAT-EDTA	ELISA Competitivo				Total
		Positivo		Negativo		
		ELISA Indirecto				
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Positivo	Positivo	7 (4.22%)	1 (0.60%)	1 (0.60%)	0	9
	Negativo	0	0	0	0	0
Negativo	Positivo	0	0	0	4 (2.41%)	4
	Negativo	1 (0.60%)	20 (12.05%)	3 (1.81%)	129 (77.71%)	153
Total		8	21	4	133	166

RB: Rosa de Bengala. **ELISA:** Ensayo inmunoenzimático. **SAT-EDTA:** Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA. **%:** Porcentaje.

Se observó que de las 166 muestras analizadas, 4.22% (7/166) sueros bovinos resultaron positivo para las cuatro pruebas, 0.60% (1/166) resultaron positivos para el iELISA y cELISA, 0.60% (1/166) resultaron positivos para RB, SAT-EDTA y cELISA, 12.05% (20/166) resultaron positivos sólo para cELISA, 0.60% (1/166) fueron positivas para RB, SAT-EDTA y iELISA, 1.81% (3/166) resultaron positivo sólo para iELISA, 2.41% (4/166) fueron positivo para SAT-EDTA, y 77.71% (129/166) fueron negativo para las cuatro pruebas (Tabla 21). En la Tabla 22 se explica en general los resultados de las pruebas diagnósticas con la situación posible en la que se encuentran las muestras.

Tabla 22

Resultados de las pruebas diagnósticas para brucelosis en muestras de tres escenarios epidemiológicos diferentes

RB	SAT-EDTA	iELISA	cELISA	Total	Posible Situación
-	-	-	-	129	Sanos
+	-	-	-	0	Posible reacción cruzada
-	+	-	-	4	Fase Aguda
-	-	+	-	3	FP/Problema cut-off
-	-	-	+	20	Problema mAb
+	+	-	-	0	Posible reacción cruzada
+	+	+	-	1	Posible vacuna
+	+	-	+	1	Problema cut-off
-	-	+	+	1	Fase Crónica
+	+	+	+	7	Infección
Total				166	

RB: Rosa de Bengala. **SAT-EDTA:** Seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA.

ELISA: Ensayo inmunoenzimático. **FP:** Falso positivo. **Cut-off:** punto de corte. **mAb:** Anticuerpo monoclonal.

CAPÍTULO 5 – DISCUSIÓN

5.1 Prueba Rosa de Bengala (RB) y prueba de seroaglutinación lenta en tubo en presencia de EDTA (SAT-EDTA)

Las técnicas de diagnóstico Rosa de Bengala (RB) y seroaglutinación lenta en tubo (SAT) son pruebas de aglutinación que se basan en la identificación de anticuerpos anti-*Brucella*, y que se caracterizan por ser sensibles y poco específicos en el diagnóstico de la enfermedad (Nielsen, 2002). Las limitaciones que presentan las pruebas de aglutinación son la presencia del efecto prozona o los falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otros microorganismos, como es el caso de *Yersenia enterocolitica* O:9 que se ha comprobado que es capaz de generar una respuesta positiva en estos dos tipos de pruebas (Gerbier et al., 1997; Godfroid et al., 2002; Weynants et al., 1996).

A pesar de los problemas en el diagnóstico, tanto RB como SAT-EDTA son empleadas como pruebas de tamiz (“screening test”) debido a sus bajos costos de operación y a la facilidad en la aplicación de las mismas (Ortiz, Alfonso, & Silva, 2008). En el caso de la prueba SAT, la OIE (2016a) no la recomienda para el diagnóstico de la brucelosis bovina debido a su baja especificidad, a pesar de haber demostrado su capacidad para el diagnóstico de las fases tempranas de la enfermedad (Baum et al., 1995; O’Grady et al., 2014).

Al aplicar las dos pruebas a las muestras de tres escenarios, se presentaron resultados similares en el diagnóstico de animales positivos y negativos. En los animales procedentes de la Isla Santa Cruz, provincia de Galápagos, ninguna de las dos pruebas logró identificar anticuerpos contra *Brucella* spp., datos que corroboran los resultados reportados por la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) en marzo del 2016 donde en la ganadería de Galápagos no se encontró brucelosis bovina (ABG, 2016). Estos resultados reafirman a Galápagos como zona indemne en la clasificación realizada por AGROCALIDAD (2009) de las regiones epidemiológicas de brucelosis bovina en Ecuador (Figura 8).

Según la escala de valoración del índice de concordancia (índice Kappa) establecido por Landis y Koch (1977), se obtuvieron diferentes grados de acuerdo entre los resultados arrojados por las dos pruebas. En el caso de las muestras del cantón El Carmen, se logró una concordancia casi perfecta (Kappa=0.8792, $p < 0.05$) debido a que de los 56 suero bovinos analizados, solamente un suero resultó positivo para la prueba SAT-EDTA y negativa para la prueba RB. Para las muestras de AGROCALIDAD, el grado de acuerdo alcanzado fue sustancial (Kappa=0.694, $p < 0.05$), debido a que de los 25 sueros bovinos analizados, tres sueros que resultaron negativos para la prueba RB, arrojaron resultados positivos para la prueba SAT-EDTA.

La prueba RB y SAT-EDTA se diferencian principalmente en la etapa de la infección que detectan, es decir, el tipo de inmunoglobulinas presente en un determinado tiempo. Esto da paso a los desacuerdos en el diagnóstico, tal como se encontró en las muestras analizadas del cantón El Carmen y de AGROCALIDAD. La prueba RB utiliza como antígeno una suspensión celular en tampón a pH ácido (pH 3.65) que evita interacciones inespecíficas y la aglutinación por anticuerpos IgM, favoreciendo la reacción con los anticuerpos del tipo IgG1 (Allan et al., 1976; M. J. Corbel, 1972). En el caso de la prueba SAT-EDTA, las células se encuentran suspendidas en un tampón a pH neutro lo que favorece la identificación de anticuerpos del tipo IgM, IgG1 e IgG2, aunque se ha comprobado que las inmunoglobulinas IgM son las que más reaccionan a un pH neutro (M. J. Corbel, 1972; K. Nielsen et al., 1984).

En las primeras etapas de la infección por *Brucella* spp. se genera una respuesta inmune humoral caracterizada por la secreción de anticuerpos del tipo IgM e IgG. Después de la exposición a la bacteria, la secreción de anticuerpos IgM ocurre de manera rápida (alrededor de dos a tres semanas después de la exposición) y desaparece después de algunos meses. Cuando los anticuerpos IgM alcanzan los títulos máximos, empieza la secreción de IgG (tres a cuatro semanas después de la exposición), perdurando por largo tiempo (Godfroid et al., 2010).

Debido a la cinética que presentan los anticuerpos durante la infección, así como de los tipos de inmunoglobulinas que son capaces de detectar tanto la prueba RB como SAT-EDTA, es posible aproximar la etapa de infección en la que se encuentran los animales enfermos. En el caso de las muestras del cantón El Carmen y de AGROCALIDAD, las muestras que presentan un

resultados positivo sólo para la prueba SAT-EDTA determina que los animales se encuentran en un estado temprano de la infección debido a que sólo se detecta la presencia de anticuerpos IgM (Baum et al., 1995; O'Grady et al., 2014), también siendo posible que los animales estuvieran vacunados, en donde los anticuerpos IgM son detectables por SAT hasta 12 meses después de la aplicación de la vacuna (Allan et al., 1976). Puesto que no se contó con los datos de vacunación de los animales, no se pudo corroborar una infección temprana, lo que evidencia la importancia de realizar una vigilancia epidemiológica del ganado y evitar pérdidas por descarte innecesario de animales.

5.2 Diagnóstico de brucelosis bovina por ELISA indirecto y selección de controles positivos y negativos

El protocolo de la prueba iELISA realizado por Ron-Román (2003) fue modificado para ajustar la concentración del antígeno LPS (0.2 µg/mL) y la dilución del conjugado G-HRPO (1/50000), además de añadir el paso de bloqueo con colágeno hidrolizado al 7.5%. Utilizando el punto de corte de 0.2835, establecido bajo las condiciones antes mencionadas, se discriminó entre muestras positivas y negativas, encontrándose una seroprevalencia del 12.5% (7/56) en las muestras procedentes del cantón El Carmen, 0% (0/85) en las muestras de la Isla Santa Cruz (Galápagos), y 20% (5/25) en las muestras de AGROCALIDAD.

La prevalencia de brucelosis bovina en el cantón El Carmen, provincia de Manabí, ha sido reportado en bajos porcentajes, como se observa en el estudio realizado por (Zambrano Aguayo & Pérez Ruano, 2015), donde obtuvo una prevalencia del 2.25% (13/578) por cELISA en hatos y mataderos del cantón El Carmen. En otro estudio realizado en el cantón El Carmen, se obtuvo una prevalencia de 5.62% (26/452) mediante la técnica iELISA (Angulo-Cruz et al., 2005). En el caso de las Islas Galápagos, no existen muchos reportes sobre prevalencia de brucelosis, pero en el 2016, la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) reportó la ausencia de *Brucella* spp. en el ganado bovino (ABG, 2016).

Según OIE (2009), la selección de sueros controles debe realizarse mediante una caracterización exhaustiva de las muestras. En el caso de la brucelosis bovina, las técnicas microbiológicas y las técnicas moleculares permiten un mejor diagnóstico de la brucelosis en un

animal, siendo consideradas como pruebas estándar (World Health Organization, 2006). En el caso de este estudio, no se pudo realizar ninguna de esas dos técnicas debido a la falta de muestras, así como de la ausencia de bioseguridad necesaria, especialmente para realizar el cultivo de la bacteria. Es por ello que se realizaron dos pruebas que presentan diferentes sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) reportadas para la detección de *Brucella* spp. (Jacques Godfroid et al., 2010): RB (Se=90-91.8%, Sp=97.8%) y SAT-EDTA (Se=81.5%, Sp=98.9%). Los resultados fueron comparados con los obtenidos en el iELISA (Tabla 18), y se escogieron 48 sueros (12 positivos y 36 negativos), como sueros control para el establecimiento del punto de corte.

5.3 Optimización de la prueba ELISA competitivo

El presente estudio tuvo como objetivo el optimizar la técnica del ELISA competitivo, lo que permitió determinar las condiciones óptimas del antígeno LPS (1µg/mL), suero (1/50), anticuerpo monoclonal (1/320) y conjugado HRP IgG anti-ratón (1/2).

Se probaron dos tipos de anticuerpos monoclonales (7F9 y 12B12) conjugados a la peroxidasa del rábano (*Horseradish peroxidase* - HRP), determinando el que reaccionaba mejor en presencia tanto del antígeno como con sueros control. El anticuerpo monoclonal 12B12 fue descartado para su uso en la optimización del cELISA debido a su baja reactividad a diferentes diluciones, necesitando una mayor concentración del anticuerpo monoclonal para poder competir con los anticuerpos presentes en los sueros problemas (Crowther, 2001).

Al evaluar diferentes diluciones del anticuerpo monoclonal 7F9 conjugado a la peroxidasa HRP frente a una sola concentración del antígeno LPS (*Figura 14*), se observó que la dilución (1/320) es un punto de inflexión de la curva, a partir del cual los valores de densidad óptica son cercanos a cero. La dilución (1/40) arrojó valores de densidad óptica de alrededor 1.6, encontrándose dentro del rango máximo de 1.5-1.7 unidades de OD, que según Crowther (2001) es necesario para obtener resultados controlables durante el ensayo y evitar datos imprecisos debidos a errores en la medición. La dilución (1/80) se encuentra dentro del rango 0.5-1.5 unidades de OD, en donde se considera que el conjugado no se encuentra en exceso dentro del ensayo (Crowther, 2001), mientras que las diluciones (1/160) y (1/320) no alcanzan ese rango.

La dilución óptima del conjugado debe permitir una diferenciación significativa entre los controles positivos y los controles negativos, además de producir la menor cantidad de reacciones inespecíficas (Cultek, 2006; Eleizalde, Caballero, & Reyna-Bello, 2007; Valmaseda et al., 2004) para un diagnóstico adecuado de la población sana y enferma. En el caso del cELISA, el anticuerpo monoclonal 7F9 se encuentra conjugado a la peroxidasa, por lo que para determinar la dilución óptima, se enfrentaron varias diluciones del mismo con dos sueros positivos y tres sueros negativos (*Figura 16*). El punto de inflexión se observó en la dilución (1/320), mismo resultado que se obtuvo cuando se enfrentó el anticuerpo monoclonal con el antígeno LPS, pero en este caso, los valores de densidad óptica arrojados para cada dilución fueron menores a 1 unidad de OD y no se obtuvo diferencias significativas entre las muestras positivas y negativas, impidiendo un diagnóstico adecuado.

Según Crowther (2001), existen tres razones principales por las que se presentan valores bajos en el ELISA. La primera se debe a una cantidad baja de antígeno disponible para la interacción con los anticuerpos. La concentración del antígeno LPS recomendada en el protocolo desarrollado por Nemery Quentin (Com. Pers. Ron-Román J. 2017), se mantuvo fija para su uso durante la optimización de la técnica debido a que está dentro del rango de 0.25-2 $\mu\text{g/mL}$, recomendado por SENASA y la OIE (2009), para evitar un exceso del antígeno que arrojen valores imprecisos por los equipos de medición.

La segunda razón corresponde a la baja concentración en la que se encuentra el anticuerpo específico para el antígeno o su baja afinidad por el antígeno. La dilución de los sueros a estudiar fue establecida en (1/50) como la dilución óptima, la misma recomendada en otros protocolos de cELISA (Gall et al., 1998; Gall & Nielsen, 1994; K. H. Nielsen et al., 1996), por lo que se centró en el anticuerpo monoclonal. La afinidad del anticuerpo monoclonal por el antígeno quedó demostrada cuando se enfrentó con el LPS, siendo las diluciones (1/40) y (1/80) las únicas que alcanzaron los parámetros recomendados.

Al descartar las dos primeras, se consideró la tercera razón: la actividad del conjugado es baja. Para determinar dicha actividad, se evaluó el anticuerpo monoclonal puro frente a un determinado volumen de la solución de sustrato, comparándolo con otro tipo de conjugado (Proteína G-HRPO). Al observar la rapidez en el cambio de color, así como la intensidad del

mismo, el anticuerpo monoclonal 7F9 resultó en un color débil en comparación con el color fuerte obtenido con la proteína G-HRPO, por lo que se determinó que la actividad de la peroxidasa conjugada al anticuerpo monoclonal es baja, posiblemente debido a problemas en el almacenamiento del mismo.

Es importante tener en cuenta que la peroxidasa conjugada al anticuerpo monoclonal debe ser estable para evitar las variaciones entre ensayos (Henning & Nielsen, 1987). La adición de aditivos como el glicerol ha demostrado aumentar la estabilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados, especialmente cuando se mantienen congelados por bastante tiempo, además se ha comprobado que tanto la trehalosa, lactoalbúmina y sacarosa conservan mejor la actividad de la peroxidasa, ya sea en estado liofilizado o reconstituido el anticuerpo monoclonal (K. Nielsen, 1995). También se debe considerar que el congelar y descongelar muchas veces contribuye a la pérdida de actividad de la enzima.

Para mejorar la diferencia entre las muestras positivas y negativas, se añadió un conjugado HRP IgG anti-ratón listo para usar de un kit comercial de ELISA competitivo. Se evaluaron tres diluciones del conjugado comercial enfrentado tanto al antígeno LPS (*Figura 17*) como a sueros control (*Figura 18*). En el primer caso se observaron valores de densidad óptica menores a los obtenidos cuando no se utilizó conjugado, siendo un ejemplo la dilución (1/40) del anticuerpo monoclonal 7F9 donde se obtuvo un valor alrededor de 0.45 unidades de OD con el conjugado HRP puro, en comparación con el valor alrededor de 1.6 unidades de OD obtenidos anteriormente (*Figura 14*). Esto sugiere que al añadir el conjugado HRP IgG anti-ratón, disminuyó la actividad de la peroxidasa conjugada al anticuerpo monoclonal, que según Gall y Nielsen (1994) puede deberse a una relación alta entre el anticuerpo monoclonal y la enzima, produciendo una degradación enzimática lenta y una inhibición negativa considerable.

En cambio, cuando se probaron el antígeno LPS y sueros control con el conjugado HRP, se observó un aumento en los valores de densidad óptica en el suero control negativo con las tres diluciones del conjugado, mientras que en el suero control positivo se observó una disminución en los valores de OD obtenidos con las tres diluciones del conjugado, siendo las diluciones (1/40) y (1/80) las únicas en alcanzar el rango de 1.5-0.5 unidades de OD, en donde el conjugado se considera óptimo (Crowther, 2001). El anticuerpo monoclonal 12B12 demostró que posee menor

afinidad que el anticuerpo monoclonal 7F9, incluso añadiendo el conjugado HRP, por lo que nuevamente se lo descartó para el uso en el cELISA.

Se observó que las diluciones (1/40), (1/80), (1/160) y (1/320) permiten diferenciar entre el suero control positivo y negativo, mientras que las cuatro diluciones restantes poseen valores tan bajos de densidad óptima que impiden una diferenciación adecuada entre los dos sueros. Al final, en función de optimizar tanto el anticuerpo monoclonal como el conjugado HRP, se seleccionó la dilución (1/320) del anticuerpo monoclonal 7F9 con la dilución (1/2) del conjugado HRP como las condiciones óptimas del cELISA, donde se observan la misma diferencia entre los sueros controles positivo y negativo que las otras diluciones.

Con las condiciones óptimas establecidas, se emplearon 12 sueros positivos y 36 sueros negativos, confirmados con las pruebas RB, SAT-EDTA y iELISA, para el establecimiento del punto de corte. El porcentaje de inhibición obtenido fue de 26.88% y se lo determinó mediante las curvas ROC, tal como lo describen Greiner et al. (1995), K.H. Nielsen et al. (1996), Crowther (2001), K. Nielsen et al. (2008), OIE (2009) y Cerda y Cifuentes (2012). Con este porcentaje de inhibición cubre los resultados positivos y negativos de los 48 sueros analizados. A parte, los 8 sueros control (4 positivos y 4 negativos) colocados en cada ensayo para ajustar el punto de corte, presentaron valores no tan cercanos al valor referencial establecido, debiéndose probablemente a la variación en los reactivos, temperaturas de incubación, temperatura de los reactivos y protocolo de lectura de resultados, tal como lo menciona Crowther (2001).

Además, como parte de la validación del cELISA, se hizo el estudio de la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica, según lo recomendado por la OIE (2009). Para evaluar la repetibilidad de la prueba se determinó el coeficiente de variación (CV), obteniéndose una CV promedio de 10.67% que está dentro del rango aceptable (<15%) de variación entre placas de ELISA (Crowther, 2001). En el caso de la reproducibilidad, se determinó el coeficiente de correlación intra-clase (ICC) al analizar 22 muestras en un mismo ensayo y laboratorio por dos operadores diferentes. El ICC que se obtuvo fue de 0.8362, el cual indica un error bajo en la medición de OD entre operadores (OIE, 2014). Además se determinó un índice de concordancia entre operadores sustancial ($Kappa=0.727$, $p<0.05$), presentándose sólo tres casos discordantes entre los dos operadores (Landis & Koch, 1977).

5.4 Diagnóstico de brucelosis bovina por ELISA competitivo y comparación con las otras técnicas

Se empleó el porcentaje de inhibición establecido como punto de corte para el análisis de 166 muestras procedentes de diferentes escenarios epidemiológicos para el diagnóstico de animales infectados con *Brucella* spp. La seroprevalencia encontrada en el cantón El Carmen fue 42.86% (24/56), de 1.18% (1/85) en la Isla Santa Cruz (Galápagos), y de 16% (4/25) en las muestras procedentes de AGROCALIDAD (Figura 20).

Al comparar los resultados del cELISA con la prueba iELISA, se evidenció una diferencia en la prevalencia de animales infectados (Tabla 20), la cual fue de 7.23% (12/166) con la prueba iELISA, mientras que por la prueba cELISA se obtuvo un prevalencia total de 17.47% (29/166). Además, se observó que 4.82% (8/166) resultaron positivo tanto para iELISA y cELISA, 2.41% (4/166) resultaron positivo sólo para iELISA, 12.65% (21/166) resultaron positivo sólo para cELISA, y 80.12% (133/166) resultaron negativo para las dos prueba. La concordancia entre las dos pruebas fue discreta, con un 84,94% de correlación entre los resultados (Kappa=0.3208, $p < 0.05$). Estos resultados difieren de los obtenidos por Gall et al. (1998), donde al comparar los resultados del iELISA-ADRI y cELISA-sLPS aplicadas a muestras procedentes de Costa Rica, Colombia, Chile y Argentina, se obtuvieron niveles de concordancias buenos, con índices Kappa de 0.825, 0.939, 0.978, y 0.855, respectivamente.

Estas diferencias se puede atribuir principalmente al tipo de anticuerpo que identifica cada prueba, que a pesar de que las dos pruebas logran identificar anticuerpos del tipo IgG, la prueba iELISA no discrimina entre los anticuerpos IgG vacunales y los anticuerpos IgG debidos a una infección natural, siendo este el caso del cELISA. Dicho de otro modo, la prueba iELISA es menos específica y más sensible que la prueba cELISA (Jacques Godfroid et al., 2010), por lo que el tipo de diagnóstico será diferente entre las dos pruebas en el caso de que las muestras provengan de animales vacunados.

Por tanto, se compararon los resultados de las cuatro pruebas de diagnóstico, con el fin de discriminar de mejor manera las muestras positivas y negativas, así como de aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas empleadas (Brenner, 1996). Los

resultados de las cuatro pruebas diagnósticas permitió clasificar 129/166 muestras negativas para todas las pruebas, 4/166 muestras positivas para SAT-EDTA, 3/166 muestras positivas para iELISA, 20/166 muestras positivas para cELISA, 1/166 muestras positivas para RB, iELISA y SAT-EDTA, 1/166 muestras positivas para RB, SAT-EDTA y cELISA, 1/166 muestras positivas para iELISA y cELISA, y 7/166 muestras positivas para todas las pruebas (Tabla 22).

De las muestras que resultaron positivas a todas las pruebas diagnósticas empleadas, se determinó que las muestras posiblemente provienen de animales que se encuentran en una fase aguda de la enfermedad debido a la detección tanto de anticuerpos IgM (SAT-EDTA) como de anticuerpos IgG (RB, iELISA, cELISA), además de confirmarse de que la presencia de anticuerpos se debe a una infección natural (cELISA positivo). En el caso de las muestras que resultaron negativas para todas las pruebas, los animales fueron catalogados como sanos debido a la ausencia de anticuerpos (IgG, IgM) contra *Brucella* spp. (Jacques Godfroid et al., 2010).

La detección de anticuerpos únicamente del tipo IgM, no necesariamente denota una fase aguda de la enfermedad hasta que se confirme con otra prueba que detecte otro tipo de anticuerpos contra la bacteria (Jacques Godfroid et al., 2010), tal como se presenta el caso de las 4/166 muestras que resultaron positivas únicamente para la prueba SAT-EDTA, que debido a los resultados negativos en las pruebas RB, iELISA y cELISA (detección de anticuerpos IgG), se las clasificó como animales en la fase aguda de la enfermedad. Por el contrario, la detección de anticuerpos únicamente del tipo IgG denota una infección en fase crónica, siendo el caso de la muestra 1/166 positiva para iELISA y cELISA, y que a pesar de arrojar un resultado negativo para la prueba RB, se la puede considera positiva para una fase crónica de la enfermedad debido a que las dos pruebas ELISA son más sensibles que la prueba RB (Jacques Godfroid et al., 2010; Klaus Nielsen, 2002).

De todas las 166 muestras analizadas, solamente una muestra resultó negativa para la prueba cELISA, siendo positiva para las pruebas RB, iELISA y SAT-EDTA. La cinética de los anticuerpos debidos a la vacunación difiere de la debida a una infección natural, donde dieciséis semanas de la vacunación, los anticuerpos no pueden ser detectados por pruebas como SAT o RB, a diferencia de las pruebas ELISA (Saegerman et al., 1999). Por tanto, los anticuerpos de la

muestra positiva para RB, iELISA y SAT-EDTA se los clasificó como vacunales (cELISA negativo).

Las muestras que resultaron positivas únicamente para la prueba cELISA (20/166) presenta un problema en el diagnóstico de los animales. Debido a que las pruebas RB y la prueba iELISA (especialmente por su sensibilidad), no detectaran los anticuerpos del tipo IgG, da la pauta a una mala clasificación de los animales por parte de la prueba cELISA. La sospecha principal recae en el monoclonal empleado en la prueba. La prueba cELISA se ve afectado por el tipo de anticuerpo monoclonal empleado para la competencia, así como de su especificidad, donde si presenta una baja especificidad para el antígeno LPS pueden producirse falsos positivos (Crowther, 2001). La producción, purificación y conservación del anticuerpo monoclonal, así como del protocolo de conjugación de la peroxidasa al anticuerpo monoclonal, también influyen en la eficiencia en el diagnóstico (Henning & Nielsen, 1987). Gall y Nielsen (1994) observaron que un anticuerpo monoclonal altamente purificado conjugado con la enzima HRPO tuvo una disminución en su capacidad de diferenciar entre los anticuerpos debidos a la vacunación y a los de infección natural. Por lo tanto, se sugiere que las 20/166 muestras sean analizadas bajo otro tipo de prueba que permita confirmar el diagnóstico negativo que resultó en las pruebas RB, iELISA y SAT-EDTA.

Finalmente, tanto las muestras que resultaron positivas para la prueba iELISA (3/166), así como la muestra que resultó positiva para las pruebas RB, SAT-EDTA y cELISA (1/166), se determinó como un mal diagnóstico por parte de las pruebas ELISA. En el primer caso, la reacción positiva para la prueba iELISA puede deberse a uniones inespecíficas o manipulación de reactivos (Crowther, 2001). Es por eso que se sugiere realizar a la vez dos o más pruebas serológicas para tener resultados que permitan descartar falsos positivos y negativos. En el segundo caso, el problema puede deberse al anticuerpo monoclonal o al establecimiento del punto de corte. La muestra proviene de la Isla Santa Cruz (Galápagos), en donde se estableció un punto de corte de 0.5285 unidades de OD para la prueba iELISA, siendo mayor al anteriormente establecido (0.2835 unidades de OD). Cuando el punto de corte es muy alto, la prueba es más propensa de arrojar falsos negativos (Lalkhen & McCluskey, 2008), por lo que es posible que la muestra sea un animal enfermo mal clasificado por la prueba iELISA.

En general, se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 83.33% para la prueba cELISA, lo que al comparar con los datos de literatura, resulta bajo para una prueba ELISA, donde generalmente se tiene una sensibilidad del 95.2% y una especificidad del 99.7% (Jacques Godfroid et al., 2010). Además los valores predictivos que se obtuvieron fueron igual de bajos, siendo un valor predictivo positivo (VPP) del 6.2% y un valor predictivo negativo (VPN) de 37.5%. Los valores predictivos permiten determinar la probabilidad de que un animal, sabiendo que está enfermo/sano, sea correctamente clasificado por la prueba a realizar. Estos valores dependen de la cantidad de animales que son analizados y están influenciados por la prevalencia de la enfermedad (Lalkhen & McCluskey, 2008). Con un VPP tan bajo, es más probable que se tenga una mayor cantidad de falsos positivos. Por otro lado, el valor tan bajo del VPP puede deberse también a la baja cantidad de animales positivos empleados para la obtención del punto de corte, siendo a penas de 12/48 animales confirmados positivos para brucelosis, además de que es posible que el problema con el anticuerpo monoclonal empleado haya influido en la detección de los controles positivos.

Por último, este estudio evidencia una falla en la conservación de los anticuerpos monoclonales, así como la necesidad de usar múltiples pruebas diagnósticas para asegurar una mejor interpretación de los resultados, mejorando el control y prevención de la brucelosis bovina en el Ecuador, evitando el descarte innecesario de animales y sus consecuentes pérdidas económicas.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

1. Se optimizó el ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA) donde se estableció una concentración de antígeno LPS de 1 µg/mL, y las diluciones de suero de 1/50, de anticuerpo monoclonal 7F9 de 1/320, y de conjugado HRP IgG anti-ratón (kit comercial) de 1/2.
2. Se determinó que el anticuerpo monoclonal 7F9 presentó una mayor reactividad frente al antígeno LPS que el anticuerpo monoclonal 12B12.
3. La prueba cELISA logró identificar anticuerpos del tipo IgG contra *Brucella* spp. en las muestras de suero bovino procedentes del cantón El Carmen, Isla Santa Cruz (Galápagos) y AGROCALIDAD.
4. Se estableció el punto de corte de la prueba cELISA en 26.88% de inhibición para el diagnóstico de brucelosis bovina, mediante la implementación de las curvas ROC.
5. Al validar la prueba, se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 83.33%, un valor predictivo positivo de 6.2% y un valor predictivo negativo de 37.5%.
6. En los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad, se obtuvo un coeficiente de variación (CV) del 10.67% y un coeficiente de correlación intra-clase (ICC) de 83.62% (índice Kappa entre operadores=0.727, $p<0.05$), respectivamente.
7. La prevalencia aparente de brucelosis bovina obtenida por la prueba cELISA en los tres escenarios epidemiológicos analizados fueron de 42.86% para el cantón El Carmen, 1.18% para la Isla Santa Cruz (Galápagos) y 16% para AGROCALIDAD.

6.2 Recomendaciones

1. Determinar un mejor protocolo para la producción, conjugación y conservación del anticuerpo monoclonal para mejorar la calidad de la prueba cELISA.
2. Realizar un registro/encuesta de los animales muestreados a fin de contar con la información sobre vacunación contra *Brucella* spp., pruebas diagnósticas realizadas, e información de la introducción de nuevos animales.

3. Realizar muestreos en escenarios epidemiológicos donde los animales sean vacunados para determinar la eficiencia de la prueba cELISA en la discriminación de anticuerpos vacunales.
4. Emplear más sueros positivos y negativos para el establecimiento de un punto de corte que presente un mejores valores predictivos.
5. Aplicar la prueba cELISA en ganado bovino de otras regiones de Ecuador.
6. Continuar estudiando la brucelosis bovina a fin de mejorar el control y prevención de la enfermedad en el país.

REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier (Vol. 8^a ed.).
- ABG. (2016). Ganaderos de Galápagos recibieron resultados de laboratorio sobre el estatus sanitario de sus animales | Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos. Retrieved February 7, 2018, from <http://bioseguridadgalapagos.gob.ec/ganaderos-de-galapagos-recibieron-resultados-de-laboratorio-sobre-el-estatus-sanitario-de-sus-animales/>
- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2001). Bacteriosis y Micosis. *Zoonosis Y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre Y a Los Animales*, (580), 266–283. Retrieved from http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19161&Itemid=
- AGROCALIDAD. (2009). *Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina*. Quito, Ecuador.
- AGROCALIDAD. (2016a). *Instructivo para los procesos de certificación y recertificación de predios libres de brucelosis y tuberculosis bovina*. Quito.
- AGROCALIDAD. (2016b). *Manual de Procedimientos para la Prevención y Control de Brucelosis Bovina en el Ecuador*. Quito.
- Alba, F. (2015). Sistema inmunitario II. Retrieved January 28, 2018, from <http://b-log-ia20.blogspot.com/2015/05/sistema-inmunitario-ii.html>
- Allan, G. S., Chappel, R. J., Williamson, P., & McNaught, D. J. (1976). A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *Journal of Hygiene*, 76(2), 287–298. <https://doi.org/10.1017/S0022172400055182>
- Angulo-Cruz, A., Tufiño-Acosta, A., Ron-Román, J., Celi-Eraza, M., Egas-Dávila, R., & Benítez-Ortíz, W. (2005). *Determinación de la prevalencia de anticuerpos contra Brucella spp., en explotaciones ganaderas de los cantones Santo Domingo y El Carmen*. Universidad Central del Ecuador.
- Asaad, A. M., & Alqahtani, J. M. (2012). Serological and molecular diagnosis of human

- brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, 5(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.02.001>
- Baldi, P. C., Samartino, L. E., & Giambartolomei, G. H. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 32(1), 117–125. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2193>
- Baum, M., Zamir, O., Bergman-Rios, R., Katz, E., Beider, Z., Cohen, A., & Banai, M. (1995). Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2166–2170.
- Blasco, J. M. (2001). Brucelosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. In *Manual de Brucelosis* (pp. 31–43). Zamora: Junta de Castilla y León.
- Brenner, H. (1996). How independent are multiple “independent” diagnostic classifications? *Statistics in Medicine*, 15(13), 1377–1386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19960715\)15:13<1377::AID-SIM275>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19960715)15:13<1377::AID-SIM275>3.0.CO;2-#)
- CABI. (2017). Brucellosis (*Brucella abortus*). Retrieved December 6, 2017, from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90735>
- Camila Medina, M. (2011). Generalidades de las pruebas diagnósticas, y su utilidad en la toma de decisiones médicas Title: Overview of Diagnostic Tests and Their Usefulness in Medical Decisions Making. *Rev. Colomb. Psiquiat*, 40(4). Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcp/v40n4/v40n4a15.pdf>
- Carvalho, L. S., Silva, O. B. da, Almeida, G. C. da, Oliveira, J. D. de, Parachin, N. S., & Carmo, T. S. (2017). Production Processes for Monoclonal Antibodies. In *Fermentation Processes* (pp. 182–198). <https://doi.org/10.5772/64263>
- Castro, H., González, S., & Prat, M. I. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(2), 203–216. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53539208>
- Cerda, J., & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-

- prácticos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 138–141. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
- CFSPH. (2009). Brucelosis. *Brucelosis Última*, 1–15.
- Christopher, S., Umapathy, B., & Ravikumar, K. (2010). Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of Laboratory Physicians*, 2(2), 55. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.72149>
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.-J., & Muraille, E. (2007). MyD88-Dependent Activation of B220-CD11b+LY-6C+ Dendritic Cells during *Brucella melitensis* Infection. *The Journal of Immunology*, 178(8), 5182–5191. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5182>
- Corbel, M. J. (1972). Characterisation of antibodies active in the Rose Bengal plate test. *Veterinary Record*, 90, 484–485. <https://doi.org/10.1017/S0022172400022622>
- Corbel, M., & Morgan, W. (1982). Clasificación del género *Brucella*: situación presente. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 1(1), 301–310.
- Crowther, J. R. (2001). *The ELISA Guidebook. Methods in Molecular Biology* (Vol. 149). Human Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cultek. (2006). Fundamentos y Tipos de ELISAs. Retrieved February 12, 2018, from <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
- Díaz, E., Hernández, L., Valero, G., & Arellano, B. (2000). *Diagnóstico de Brucelosis Animal*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Díaz, R., Blaco, J., Almaraz, A., Martínez, F., Ruiz, C., & Abad, R. (2001). La brucelosis. Etiología y origen de la infección humana. In *Manual de Brucelosis* (pp. 13–20). Zamora: Junta de Castilla y León.
- Eleizalde, M., Caballero, H., & Reyna-Bello, A. (2007). Evaluation and Improvement of an Immunoenzimatic Assay (ELISA) for Diagnosis of Bovine Anaplasmosis, Using Recombinant MSP5 as Antigen. *Revista Científica FCV-LUZ*, XVII(4), 349–356.
- Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology*, 5(6), 859–866.

<https://doi.org/10.2217/FMB.10.52>

- Fretin, D. (2013). Diagnostic of brucellosis: difficulties and prospects, 10–11. Retrieved from http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/_documents/2014-02_labinfo11-p10_en.pdf
- Gall, D., Colling, A., Marino, O., Moreno, E., Nielsen, K. H., Perez, B., & Samartino, L. E. (1998). Enzyme immunoassays for serological diagnosis of bovine brucellosis: A trial in Latin America. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(5), 654–661. Retrieved from [papers3://publication/uuid/089E7FB2-7774-48AF-8B37-133D905834B4](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9898983/)
- Gall, D., & Nielsen, K. (1994). Improvements to the competitive elisa for detection of antibodies to brucella abortus in cattle sera. *Journal of Immunoassay*, 15(3), 277–291. <https://doi.org/10.1080/15321819408009578>
- Gerbier, G., Garin-Bastuji, B., Pouillot, R., Véry, P., Cau, C., Berr, V., ... Moutou, F. (1997). False positive serological reactions in bovine brucellosis: Evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Veterinary Research*, 28(4), 375–383. <https://doi.org/S0928424997840941> [pii]
- Godfroid, J. (2002). Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 21(2), 277–286.
- Godfroid, J., Nielsen, K., & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal*, 51(4), 296–305. <https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.296>
- Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., Walravens, K., Letesson, J. J., Tibor, A., ... Garin-Bastuji, B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 461–477. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00230-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00230-4)
- Gómez, M. (2016). *Estandarización de la técnica inmunoenzimática (ELISA) mediante el uso de una proteína recombinante “BRUD” contra Brucella sp. en ganado bovino*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Greiner, M., Sohr, D., & Göbel, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off

- values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods*, 185(1), 123–132. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00121-P](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00121-P)
- Henning, D., & Nielsen, K. (1987). Peroxidase-labelled monoclonal antibodies for use in enzyme immunoassay. *Journal of Immunoassay*, 8(4), 297–307. <https://doi.org/10.1080/15321818708057029>
- IICAB. (2009). Brucellosis bovina: *Brucella abortus*. *The Center for Food Security & Public Health*, 1–6.
- INEC. (2011). *Datos estadísticos agropecuarios*. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Retrieved from http://www.inec.gob.ec/espac_publicaciones/espac-2011/INFORME_EJECUTIVO_2011.pdf
- Kimball, J. W. (2011). Using Next-Generation Sequencing for Discovery of High-Frequency Monoclonal Antibodies in the Variable Gene Repertoires from Immunized Mice. *Online Text Book*, 1131, 191–203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-049-7:233>
- Lalkhen, a. G., & McCluskey, A. (2008). Clinical tests: sensitivity and specificity. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 8(6), 221–223. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkn041>
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159. <https://doi.org/10.2307/2529310>
- López-Goñi, I., & Moriyón, I. (2004). *Brucella: molecular and cellular biology*. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20043211893.html>
- Madkour, M. (2014). Historical aspects of brucellosis. In *Brucellosis* (p. 308). Elsevier.
- Mantur, B. G., Amarnath, S. K., & Shinde, R. S. (2007). Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25(3), 188–202. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.34758>
- Martirosyan, A., & Gorvel, J.-P. (2013). *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiology*, 8(2), 147–154. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.140>
- Maurin, M. (2005). La brucellose à l'aube du 21^e siècle. *Medecine et Maladies Infectieuses*.

<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2004.08.003>

- Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
- Moreno, E., Cloeckaert, A., & Moriyón, I. (2002). Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00210-9)
- Neta, A. V. C., Mol, J. P. S., Xavier, M. N., Paixão, T. A., Lage, A. P., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of bovine brucellosis. *Veterinary Journal*, 184(2), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.010>
- Nielsen, K. (1995). Stability of Freeze Dried Horseradish Peroxidase Conjugated Mono-Clonal Antibodies Used in Diagnostic Serology. *Journal of Immunoassay*, 16(2), 183–197. <https://doi.org/10.1080/15321819508013557>
- Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 447–459. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
- Nielsen, K. H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P., & Kelly, W. (1996). Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 26(1), 17–32. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167587795005137>
- Nielsen, K., Heck, F., Wagner, G., Stiller, J., Rosenbaum, B., Pugh, R., & Flores, E. (1984). Comparative assessment of antibody isotypes to Brucella abortus by primary and secondary binding assays. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1–4), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90063-1](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90063-1)
- Nielsen, K., Kelly, L., Gall, D., Nicoletti, P., & Kelly, W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 46(3–4), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)05361-U](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)05361-U)
- Nielsen, K., Smith, P., Yu, W. L., Elmgren, C., Halbert, G., Nicoletti, P., ... Renteria, T. (2008). Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Veterinary Immunology and*

Immunopathology, 125(3–4), 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.015>

- O’Grady, D., Byrne, W., Kelleher, P., O’Callaghan, H., Kenny, K., Heneghan, T., ... Ryan, F. (2014). A comparative assessment of culture and serology in the diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *Veterinary Journal*, 199(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.01.008>
- OIE. (2005). OIE World Animal Health Information System. Retrieved December 6, 2017, from https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=30&species_t=2&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_metho
- OIE. (2009). Principios y Métodos de Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Manual Acuático de La OIE*, 1–20.
- OIE. (2010). Brucelosis. Retrieved from <http://www.oie.int/doc/ged/D13939.PDF>
- OIE. (2014). Enfoques Estadísticos de la Validación. In *Manual Acuático de la OIE 2014* (pp. 1–12). OIE.
- OIE. (2016a). Brucelosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*) (Infección por *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*). In *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres* (pp. 1–47). Organización Mundial de Sanidad Animal.
- OIE. (2016b). Brucelosis bovina. In *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres* (pp. 1–47). Organización Mundial de Sanidad Animal. Retrieved from [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.03.Brucelosis bovina.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.04.03.Brucelosis%20bovina.pdf)
- Orduña, A., López, L., Gómez, M. ., Gutiérrez, P., Fernández, J. ., & Rodríguez, A. (2001). Patogenia de la brucelosis humana. In *Manual de Brucelosis* (p. 148). Zamora: Junta de Castilla y León.
- Ortiz, E., Alfonso, M. J., & Silva, E. (2008). Diagnóstico de laboratorio de la brucelosis bovina. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 31, 26–33.
- Padrón, O., Martínez, D., Peniche, Á., & López, L. (2011). Historia de la brucelosis. *Revista de Divulgación Científica Y Tecnológica de La Universidad Veracruzana*, XXIV(2). Retrieved

from <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/brucelosis/>

- Paredes, S. (2012). *Determinar la prevalencia de brucelosis bovina y factores de riesgo en la parroquia Alluriquin, Recinto Cristal de Lelia*. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Retrieved from http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5566/1/T-ESPE-IASA_II_002457.pdf
- Peeridogaheh, H., Golmohammadi, M. G., & Pourfarzi, F. (2013). Evaluation of ELISA and Brucellacapt tests for diagnosis of human Brucellosis. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(1), 14–18. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577553/pdf/IJM-5-14.pdf>
- Perrett, L. L., McGiven, J. A., Brew, S. D., & Stack, J. A. (2010). Evaluation of competitive ELISA for detection of antibodies to Brucella infection in domestic animals. *Croatian Medical Journal*, 51(4), 314–9. <https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.314>
- Pita Fernández, S., & Pértegas-Díaz, S. (2003). Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria*, 120–124. [https://doi.org/Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña \(España\)](https://doi.org/Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España))
- Portuondo Paisan, Y., & Portuondo Moret, J. (2010). La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. *Tecnología Química*, 2(2), 117–121. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/4455/445543770014.pdf>
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J. C., & Müller, M. (2011). pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>
- Rodríguez, A., Orduña, A., Ariza, X., Moriyon, I., Diaz, R., Blaco, J., ... Abad, R. (2001). Bacteriología del género Brucella. In *Manual de Brucelosis* (p. 148). Zamora: Junta de Castilla y León. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Manual+de+brucelosis#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Manual+de+Brucelosis%230>
- Ron-Román, J. (2003). *Validación de técnicas diagnósticas para la detección de brucelosis y*

estudio epidemiológico en una región andina del Ecuador. Instituto de Medicina Tropical (IMT) “Príncipe Leopoldo,” Amberes, Bélgica.

- Saegerman, C., Vo, T. K., De, W. L., Gilson, D., Bastin, A., Dubray, G., ... Godfroid, J. (1999). Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Veterinary Record*, *145*(8), 214–218. Retrieved from papers3://publication/uuid/2BFD25BD-20EA-49C0-BEB7-137A8650706B
- Saldarriaga, O. a, & Rugeles, M. T. (2002). Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp : Fundamentos para una estrategia vacunal. *Rev Col Cienc Pec*, *15*(2), 188–197.
- SENASA, & OIE. (2009). Manual de Diagnóstico serológico de Brucelosis Bovina, 1–95.
- Torres, H. (2008). *Control de Brucelosis Bovina - Programa Nacional*. Quito.
- Valmaseda, T., Alba, L., Ochoa, R., Moya, A., Pino, Y., & Esnard, S. C. (2004). Determinación de las condiciones de ensayo óptimas en un ELISA para la detección de anticuerpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O11. *Vaccimonitor*, *13*(3), 18–26.
- von Bargen, K., Gorvel, J.-P., & Salcedo, S. P. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(3), 533–562. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x>
- Wang, X., Wang, Y., Ma, L., Zhang, R., De, Y., Yang, X., ... Wu, Q. (2015). Development of an improved competitive ELISA based on a monoclonal antibody against lipopolysaccharide for the detection of bovine brucellosis. *BMC Veterinary Research*, *11*(7), 118. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0436-3>
- Weaver, D., St Jean, G., & Steiner, A. (2005). General considerations and anaesthesia. In *Bovine surgery and lameness* (2nd ed.). Oxford: Blackwell. <https://doi.org/10.1037/023990>
- Weynants, V., Tibor, A., Denoel, P. A., Saegerman, C., Godfroid, J., Thiange ', P., & Letesson, J.-J. (1996). Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* 0:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. *ELSEVIER Veterinary Microbiology*, *48*, 101–12. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00153-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00153-0)
- World Health Organization. (2006). *Brucellosis in humans and animals Brucellosis in humans*

and animals. World Health Organization.

Zambrano Aguayo, M. D., & Pérez Ruano, M. (2015). Seroprevalencia de brucelosis en ganado bovino y en humanos vinculados a la ganadería bovina en las zonas norte y centro de la provincia Manabí, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 37(3), 164–172. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_text&pid=S0253-570X2015000300004&lang=pt