

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO

Tema: “Evaluación de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina.”

Trabajo de titulación previa la obtención del
Título de Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario

AUTOR: Carlos Fabricio Naranjo Garcia


TUTOR: Ing. Edison Marcelo Ibarra Rosero MSc.


Tulcán, 2021

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR

Certificamos que el estudiante Naranjo Garcia Carlos Fabricio con el número de cédula 2100925318 ha elaborado el trabajo de titulación: "Evaluación de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina."

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de Titulación, Sustentación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizamos la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.


f.....
Ibarra Rosero Edison Marcelo
TUTOR


f.....
Martin Rolando Campos Vallejo
LECTOR

Tulcán, septiembre de 2021

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente trabajo de titulación constituye requisito previo para la obtención del título de Ingeniero en la Carrera de Ingeniería en Desarrollo Integral Agropecuario de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales

Yo, Naranjo Garcia Carlos Fabricio con cédula de identidad número 2100925318 declaro: que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

f. 
Naranjo Garcia Carlos Fabricio
AUTOR

Tulcán, septiembre de 2021

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Naranjo Garcia Carlos Fabricio declaro ser autor de los criterios emitidos en el trabajo de investigación: "Evaluación de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina." y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

f. 

Naranjo Garcia Carlos Fabricio

AUTOR

Tulcán, septiembre de 2021

AGRADECIMIENTO

A mis Padres por motivarme y brindarme su apoyo incondicional en todos los momentos difíciles del transcurso de la etapa de estudiante.

Un agradecimiento al personal del laboratorio de la UPEC por la ayudarme en el proceso para realizar el diagnóstico de las muestras sanguíneas realizadas en laboratorio.

A los propietarios y trabajadores de las fincas ganaderas del cantón Huaca y Tulcán Mira y Bolívar, por su participación y gran colaboración en el transcurso de la presente investigación.

A la Universidad Politécnica Estatal del Carchi, primordialmente a la escuela de Desarrollo Integral Agropecuario y como también a todos los docentes que fueron parte de mi formación académica en esta institución.

Al tutor de la investigación Ing. Marcelo Ibarra MSc. Por compartir sus conocimientos y por sus excelentes sugerencias y ayuda constante durante el avance y finalización de la presente investigación.

Al lector de la investigación Dr. Martin Campos MSc, por su apoyo y seguimiento en transcurso del desarrollo de esta actual investigación.

A todos los compañeros y amigos los cuales han vivido mis satisfacciones y angustias, mostrando su comprensión y apoyo incondicional en todos los momentos y así poder culminar este sueño tan esperado.

DEDICATORIA

A DIOS, por su infinito amor y esperanza, brindándome salud y la inteligencia necesaria para concluir una etapa más de mi vida.

A mi madre Rosa Lucila Garcia y a mi padre Marcos Aurelio Naranjo Camacho, por todo su esfuerzo que ha dispuesto en sus hijos, tratando de brindarme todo lo necesario en la vida, por su inmenso amor que ahora me ha permitido llegar lejos y cumplir mis objetivos.

A mi hermano y hermanas que con su gran apoyo brindado en todos estos años para alcanzar la culminación de mis estudios.

A todas las personas que estuvieron a mi lado y me brindaron su ayuda incondicional para poder conseguir esta meta planteada.

ÍNDICE

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR	2
AUTORÍA DE TRABAJO	3
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	4
AGRADECIMIENTO	5
DEDICATORIA	6
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCION	13
I. PROBLEMA	14
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	16
1.3. JUSTIFICACIÓN	16
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	17
1.4.1. Objetivo General	17
1.4.2. Objetivos Específicos	17
1.4.3. Preguntas de Investigación	17
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	18
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	18
2.2. MARCO TEÓRICO.....	23
2.2.1 Importancia de la brucelosis	23
2.2.2 Situación Brucelosis en el mundo y distribución.....	24
2.2.2.1 La brucelosis animal en Ecuador	25
2.2.2.2 La Brucelosis en la Provincia del Carchi	25
2.2.3. Etiología.....	25
2.2.4. Transmisión y propagación de la enfermedad	26

2.2.5. Signos y síntomas	27
2.2.6. Respuestas Inmunes	28
2.2.7. Diagnóstico	28
2.2.7.1. Diagnóstico Clínico	28
2.2.7.2. Pruebas de Diagnóstico Directo.....	29
2.2.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.2.7.4. Pruebas de diagnóstico de cultivo:	29
2.2.8. Pruebas de diagnóstico Indirecto.	29
2.2.8.1. Prueba de anillo en leche:	29
2.2.8.2 Prueba de Fijación del Complemento:	30
2.2.8.3 Prueba de Elisa Inmunoenzimatica Indirecta (ELISA-i):	30
2.2.8.4. Prueba de Elisa competitiva (c-ELISA):	31
2.2.8.5 Rosa de Bengala:	31
2.2.8.6. Prueba de Fluorescencia Polarizada (“FPA”)	32
2.2.9. Prevención y control	33
2.2.9.1 Vacunación	33
2.2.9.2. La vacuna S19	34
2.2.9.3. La vacuna RB-51	34
III. METODOLOGÍA.....	35
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO.....	35
3.1.1. Enfoque	35
3.1.2. Tipo de Investigación	35
3.1.2.1 Exploratoria	35
3.2. HIPÓTESIS O IDEA A DEFENDER	35
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	36
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS	37
3.4.1 Procedimentales	37

3.4.1.1 Fase de Campo	37
3.4.1.2 Laboratorio	37
3.4.1.2.1 Prueba del Rosa de Bengala	38
3.4.1.2.2 Prueba de Florescencia Polarizada “FPA”	38
3.4.2.3 Prueba de Elisa Competitivo.....	39
3.4.3. Análisis Estadístico	40
3.4.3.1 Prevalencia	40
3.4.3.2 Coeficiente kappa:	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. RESULTADOS.....	42
4.1.1 Comparación de las pruebas FPA en leche, Rb y cELISA	42
4.1.2 Prevalencia de brucelosis bovina a nivel de UPAs.....	42
4.1.3 Concordancia FPA en Leche y RB	43
4.1.4 Concordancia FPA en leche y cELISA.....	43
4.2. DISCUSIÓN.....	44
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
5.1. CONCLUSIONES	47
5.2. RECOMENDACIONES	48
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
V. ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etiología de Brucella Abortus.....	26
Figura 2: Signos y Síntomas de Brucella Abortus.....	27
Figura 3: Prueba de Anillo en leche	30
Figura 4: Prueba de Elisa Competitiva.....	31
Figura 5: Prueba de Rosa de Bengala.....	32

Figura 6: Prueba FPA	32
Figura 7: Fórmula para cálculo densidad	40
Figura 8: Fórmula de la prevalencia	40
Figura 10: Equipo de lectura con luz polarizada.	57
Figura 9: Muestras de leche.....	57
Figura 12: Realización Test.....	58
Figura 11 : Lectura de Test.....	58
Figura 13: Interpretación de Resultados.....	58
Figura 15: Realización Test de cELISA.....	58
Figura 14: Equipo de Lectura cELISA.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables	36
Tabla 2. Indicador	39
Tabla 3. Interpretación de resultados cualitativos del coeficiente Kappa.....	41
Tabla 4. Resultados obtenidos en la evaluación de las pruebas.....	42
Tabla 5. Índice Kappa para brucelosis bovina FPA y Rosa de Bengala.....	43
Tabla 6. Índice Kappa para brucelosis bovina FPA y cELISA.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado o Acta del Perfil de Investigación	54
Anexo 2: Certificado del abstract por parte de idiomas.....	55
Anexo 3: Figuras test FPA, Rosa de Bengala y cELISA.....	57

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar la prueba de Fluorescencia Polarizada (FPA) en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina comparada con la prueba Rosa de Bengala (RB) y ELISA competitivo (cELISA) en suero en la provincia del Carchi. El diagnóstico se realizó a un total de 99 UPAs, a través de la prueba FPA en leche, y a un total de 1668 animales a través de la prueba RB y cELISA en suero. El levantamiento de información y muestreo se realizó en dos fases una de campo y otra de laboratorio: la fase campo inició con la socialización del proyecto, seguido con la toma de muestras de leche de cada UPA, y posterior a ello la toma de muestras sanguíneas de cada uno de los animales lactantes por UPA; la fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la UPEC donde se desarrolló las pruebas FPA en leche, RB y cELISA en suero sanguíneo. Con diagnóstico realizado se analizó mediante estadística descriptiva la prevalencia de la enfermedad considerando la prueba FPA en leche, la determinación del coeficiente Kappa para identificar la concordancia entre las pruebas utilizadas, y finalmente una comparación descriptiva de las pruebas diagnósticas en estudio, para lo cual se consideró como UPA positiva cuando al menos un animal sea confirmado como positivo mediante la prueba cELISA. Los resultados analizados permitieron obtener una prevalencia de brucelosis bovina a nivel de UPAs de 27,27 %. El coeficiente Kappa permitió identificar una concordancia buena 0,608 (0,450 – 0,767 IC 95%) entre FPA en leche y RB, y una concordancia muy buena 0,854 (0,740 – 0,967 IC 95%) entre FPA en leche y cELISA. En la comparación de las pruebas diagnósticas: (1) 26 resultaron positivas a los tres test, (2) una positiva a FPA y negativa a RB y cELISA, (3) dos positivas a RB, cELISA y negativa a FPA, (4) 19 positivas a RB y negativas a FPA y cELISA, y (5) 51 negativas a las tres pruebas. Con la interpretación de resultados se recomienda utilizar el esquema de diagnóstico para brucelosis bovina en la provincia del Carchi de FPA en leche para tamiz o screening a nivel de UPAs, seguido del diagnóstico con RB de los animales de UPAs positivas, y la confirmación de los animales positivos a RB mediante la prueba cELISA.

Palabras claves: brucelosis, fluorescencia polarizada, leche.

ABSTRACT

The present research was carried out with the aim of evaluating the Polarized Fluorescent Test (PFT) in milk for the diagnosis of bovine brucellosis compensated with the Rose of Bengal (RB) test and competitive ELISA (cELISA) in serum in the province of Carchi. The diagnosis was made to a total of 99 UPAs, through the PFT test in milk, and a total of 1668 animals through the RB and cELISA test in serum. The collection of information and sampling was carried out in two phases one field and one laboratory: The field phase began with the socialization of the project, followed by the collection of milk samples from each UPA, and then the collection of blood samples from each of the infant animals by UPA; the laboratory phase was carried out in the veterinary diagnostic laboratory of the UPEC where the PFT tests were developed in milk, RB and cELISA in blood serum. With a diagnosis made, the prevalence of the disease was analyzed using descriptive statistics considering the PFT test in milk, the determination of the Kappa coefficient to identify the concordance between the tests used, and finally a descriptive comparison of the diagnostic tests under study, for which it was considered as positive UPA when at least one animal is confirmed as positive by the cELISA test. The results analyzed allowed to obtain a prevalence of bovine brucellosis at the level of UPAs of 27.27 %. The Kappa coefficient identified a good 0.608 (0.450 – 0.767 CI 95%) agreement between PFT in milk and RB, and a very good 0.854 (0.740 – 0.967 CI 95%) agreement between PFT in milk and cELISA. In the comparison of the diagnostic tests: (1) 26 were positive for the three tests, (2) one positive for PFT and negative for RB and cELISA, (3) two positive for RB, cELISA and negative for PFT, (4) 19 positive for RB and negative for PFT and cELISA, and (5) 51 negative to all three tests. With the interpretation of results, it is recommended to use the diagnostic scheme for bovine brucellosis in the province of PFT Carchi in milk for screening or screening at the level of UPAs, followed by diagnosis with RB of animals of positive UPAs, And confirmation of the RB-positive animals by cELISA test.

Keywords: brucellosis, polarized fluorescence, milk

INTRODUCCION

La provincia del Carchi sobresale por su producción láctea, pero así mismo es considerada como una de las zonas con altos índices de prevalencia de brucelosis bovina, según investigaciones donde muestran una prevalencia del 1,97 al 10,62 % de la enfermedad (AGROCALIDAD, 2009).

La brucella es una enfermedad infecto-contagiosa que limita el desarrollo ganadero debido principalmente a sus afectaciones en hembras de etapa reproductiva como son abortos, metritis, disminución de la fertilidad, nacimiento de animales débiles; en los machos la enfermedad se presenta con alteraciones testiculares, pérdida de fertilidad debido a la orquitis y epididimitis. Además, debido a su característica zoonótica puede transmitirse al humano generándose un problema de salud pública (AGROCALIDAD, 2008).

Para el diagnóstico de brucelosis bovina en el Ecuador Agrocalidad definió un esquema de muestreo en donde en primer lugar utiliza la prueba de anillo en leche para identificar UPAs. Las UPAs positivas se las realiza un muestreo serológico de los animales; muestras a las que se realiza la prueba de Rosa Bengala como tamiz y la prueba ELISA competitiva como confirmatoria (AGROCALIDAD, 2008). El esquema antes mencionado es recomendado por la Organización Internacional de Sanidad Animal, pero tiene el inconveniente que la prueba de anillo en leche a pesar de ser de alta sensibilidad, tiene el problema de ser dependiente de la grasa de la leche, no puede realizarse en leche de animales con mastitis, o calostro y no discrimina animales vacunados de naturalmente infectados (Maldonado, Kowalski, Milla, & Villasmil, 2010).

Para el diagnóstico de brucelosis existen muchas pruebas de diagnóstico pero una sola no es suficiente para diagnosticar animales sanos y enfermos, por tal motivo se recomienda utilizar prueba de tamiz como es la Rosa de Bengala (RB), y pruebas de cELISA como pruebas confirmatorias, aunque también existe la prueba de fluorescencia polarizada (FPA), que es una prueba poco conocida y utilizada en Ecuador para el diagnóstico de la brucelosis (Cevallos, 2018).

Considerando los inconvenientes que presenta la prueba de anillo en leche y la poca información del uso de la prueba FPA en leche, la investigación tiene como objetivo evaluar la prueba FPA en leche comparándola con RB y cELISA.

I. PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La brucelosis es declarada por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Sanidad Animal como la enfermedad zoonótica con mayor persistencia a nivel mundial, se encuentra en la lista de enfermedades de reporte obligatorio, en los países en vías de desarrollo se encuentra en niveles muy alto de prevalencia, debido a los inadecuados sistemas de explotación animal que su gran número son de características tradicionales, y la falta de sistemas eficientes de rastreo epidemiológico de la enfermedad (OIE, 2004).

La brucella bovina, es una enfermedad de carácter zoonótico es decir puede transmitirse a otras especies animales, el ser humano puede infectarse por el consumo de sus productos sin pasteurizar, mala cocción o por contacto directo de heridas con restos de tejidos animales infectados en las labores de manejo de las Unidades de Producción Agropecuarias, también aquellas personas que se encuentran en los procesos de faenamiento del ganado vacuno, se encuentra distribuida a nivel del mundo, es originada por diferentes géneros de la especie *Brucella*, su principal afectación es: promueve el aborto, baja producción láctea y problemas de fertilidad. Las especies animales más propensas a la enfermedad son: caprinos (*B. melitensis*) bovinos (*B. abortus*), ovinos (*B. ovis*) y porcinos. (*B. suis*) (AGROCALIDAD, 2009).

En el Ecuador las pérdidas económicas por la prevalencia de brucelosis están estimadas en 5'436.908 USD según datos del programa nacional de brucelosis 2009, considerándose la mayor afectación en la producción láctea del país, presentándose el mayor problema en la región sierra ecuatoriana considerada como la cuenca lechera del país, formada por: Pichincha, Imbabura, Carchi, Tungurahua Cotopaxi, y Chimborazo, con un porcentaje de prevalencia de la enfermedad del 1.97 al 10.62% (AGROCALIDAD, 2009).

Las principales pruebas recomendadas para el diagnóstico de la brucelosis bovina son: las pruebas de rosa de bengala como tamiz, cELISA y Fluorescencia Polarizada (FPA) como

pruebas confirmatorias; en el Ecuador las pruebas de FPA y cELISA son pruebas que se han realizado en muy pocos estudios y por ende, se conoce muy poco de su especificidad y sensibilidad, en un contexto donde interpretar los resultados de las pruebas es difícil debido a una incorrecta forma de aplicación y el escaso uso de registros de vacunación en las UPAs (OIE, 2016).

En la Provincia del Carchi se usa pruebas diagnósticas de brucelosis las cuales se desconoce sus características, además de ser ineficientes y no ser realizadas con un protocolo adecuado lo que provoca que se puedan llegar a obtener datos erróneos. En el Ecuador Agrocalidad menciona que para el diagnóstico de brucelosis bovina se utilizara la prueba de anillo en leche y rosa de bengala como tamizaje y la de ELISA competitivo como prueba confirmatoria, no obstante, la técnica de anillo en leche presenta resultados variables dependiendo del número de animales que aportan leche a la muestra y presencia de leche de vacas con mastitis o de calostro en la muestra. Además, la PAL es una prueba subjetiva producto de la apreciación visual del analista (Maldonado, Kowalski, Milla, & Villasmil, 2010). Además, en relación al proceso de extracción sanguínea requerido para las pruebas de Rosa de bengala y ELISA que generan un estrés y son de carácter invasivo (Rosero, Rosales, Benavides, Cortez, & Cevallos, 2018).

También para el test de anillo en leche debe tomarse en cuenta que no se puede realizar en leches pasteurizadas, la homogenización que se realiza durante el proceso de industrialización de la leche y la agitación brusca interfiere con la prueba y consecuentemente en los resultados, la escases o exceso de grasa dificulta la interpretación de la prueba, puede existir falsos negativos debido a que existen animales que no eliminan anticuerpos en leche a pesar de ser positivos a la enfermedad. Puede existir reacciones falsas positivas por: presencia de calostro, leche de vacas próximas a entrar al período de seca, reacciones inespecíficas cuando se adicionan preservantes a la leche, animales con mastitis, animales con desordenes hormonales y variaciones en el almacenamiento y temperatura de la muestra. siendo importante también usar muestras sanguíneas que sean conservadas en condiciones adecuadas desde su extracción hasta su procesamiento en laboratorio, por lo tanto, las muestras no deben encontrarse hemolizadas o contaminadas, la temperatura de almacenamiento debe estar en un intervalo menor o igual a 8 °C, además, los tubos deben estar secos, limpios y perfectamente rotulados para evitar falsos positivos o negativos por tal motivo (Castro, 2015).

Además, al momento de realizar la interpretación de los resultados de las pruebas de diagnóstico pueden presentarse casos de falsos positivos esto puede estar relacionado a

reacciones cruzadas de algunas bacterias y por la presencia de anticuerpos vacunales de S19. Siendo importante el uso de registros sanitarios de vacunación en los predios ganaderos a fin de determinar si existe la posibilidad de una reacción cruzada por Ab anti *brucella* (Rosero, 2013), por tal motivo, se recomienda cuando exista la sospecha de estos casos ingresar a los animales a un proceso de cuarentena y realizar pruebas confirmatorias para descartar (Santos, 2016).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El esquema de diagnóstico de brucelosis bovina (PAL – RB – cELISA) en la Provincia del Carchi es ineficiente y costoso?

1.3. JUSTIFICACIÓN

La prueba de fluorescencia polarizada puede ser utilizada en sangre, suero sanguíneo y leche, además que puede ser desarrollada fuera de un laboratorio. Es una prueba que tiene la capacidad de diferenciar entre animales vacunados con aquellos naturalmente infectados. Además de ser una prueba con alta sensibilidad y especificidad, 99,02% y 99,96% respectivamente (Nielsen, y otros, 1996).

La leche es un tipo de muestra ideal para el diagnóstico de anticuerpos de cualquier tipo de enfermedad en bovinos, debido a que es de fácil colecta, al ser un método no invasivo, además que puede ser adaptable a un gran número de animales con una sola prueba (Nielsen & Gall., 2001).

La prueba de fluorescencia polarizada en leche puede ser aplicada tanto en muestras individuales como también en tanques, sin perder su capacidad analítica por el factor de dilución presente en otras pruebas diagnósticas en leche para brucelosis, y también muestra una sensibilidad y especificidad similar a la prueba FPA en suero, de 100% y 99,1% respectivamente Gall, Nielsen, Bermudez, Moreno, & Smith, (2002) además que permite también discriminar animales vacunados de aquellos naturalmente infectados (Nielsen & Gall., 2001).

FPA en leche es una prueba altamente reproducible entre laboratorios y equipos, además que reduce el error humano y la variabilidad de resultados al momento de realizar la prueba, como

cuando se realiza la interpretación de resultados de pruebas de aglutinación como RB y otras similares, ya que es una prueba cuantitativa; además que el diagnóstico completo puede ser realizado en una solución en un solo tubo o pocillo sin realizar procesos de solución ni pasos de lavado como se realiza en otro tipo de pruebas enzimáticas como los ELISA (Nielsen & Gall., 2001).

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

- Evaluar la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina.”

1.4.2. Objetivos Específicos

- Comparar el resultado diagnóstico de las pruebas FPA en leche, Rosa de Bengala y cELISA en suero.
- Determinar la correlación analítica de las pruebas serológicas en leche (FPA) y suero sanguíneo (RB y cELISA) mediante el índice Kappa.
- Determinar la prevalencia de brucelosis bovina mediante la prueba de FPA en leche en la provincia del Carchi.

1.4.3. Preguntas de Investigación

- ✓ ¿Existe diferencia entre las pruebas FPA en leche, Rosa de bengala y cELISA en suero para el diagnóstico de brucelosis bovina?
- ✓ ¿Cuál será la correlación analítica entre la prueba de (FPA) en leche y (RB y cELISA) en suero sanguíneo mediante el índice Kappa?
- ✓ ¿Cuál será la prevalencia de brucelosis bovina mediante la prueba de FPA en leche en la provincia del Carchi?

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Según Cevallos (2018), en un estudio realizado con la finalidad de evaluar la especificidad de la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” en la Provincia del Carchi en bovinos inmunizados con S19, tomó en cuenta un número de seis terneras, de edad entre 3 y 8 meses, a las cuales se las inmunizó con la vacuna S19, luego de haber dado negativo a la prueba diagnóstica de cELISA, y se realizó la toma de muestras semanales durante un tiempo determinado de 39 semanas. En la cual se logró determinar que la especificidad de la prueba “FPA” en la semana 26 es del 100%. Además, recomiendan aplicar la prueba “FPA” luego de un periodo post vacunación de 6,5 meses para así evitar los falsos positivos que se pueden presentar por la vacuna S19.

De acuerdo a Cevallos, Falques & Meza Pauta (2020), en el laboratorio bromatológico de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo campus “La María” realizó un estudio donde se logró establecer mediante la prueba rosa de bengala la prevalencia de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*), en la cual se estudió 370 animales de fincas ganaderas del sector, las variables investigadas fueron existencia de la enfermedad, edad, sexo, origen y raza de los animales. Donde se obtuvo un total de 28 animales positivos con una prevalencia del 19.18% sin que estos animales presenten cuadros clínicos aparentes. Además, se pudo determinar que las hembras tienen una mayor susceptibilidad con 27 casos positivos (7,29 %) y machos 1 caso positivo (0.27 %). En cuanto a la raza del total de animales muestreados obtuvieron como animales positivos respectivamente a cada raza 13 (3.51%) de cruce mestizo (Brahmán x Brown Swiss), Girolando 3 (0.81%) Brahman x Holstein 9 (2.43%), Jersey 2 (0.54%) y Brahman 1 (0.27%). En cuanto a la edad los casos positivos se presentaron el 2.97% en animales de edades entre 2-4 años, el 2.43% de 5-7 años y entre 8-12 años 2.16%. además, se determinó que las pérdidas económicas estimadas por causa de la enfermedad son de \$ 750 dólares por lo que recomendaron que las fincas ganaderas del cantón empalme deben implementar un sistema de control sanitario que permita controlar y erradicar la enfermedad ya que las pequeñas, medianas y grandes empresas se ven afectados económicamente ya que la salud animal va de la mano de la economía de las empresas pecuarias.

Tal como lo menciona Chavisnan (2018), realizo un estudio en la provincia del Carchi Cantón Montúfar la cual tuvo como objeto conocer en vacas en producción lechera, los factores de riesgos asociados a la brucelosis bovina (*Brucella abortus*). En la cual realizó la prueba a 380 vacas mayores a dos años, pertenecientes a 30 Upas, a las que se les realizo una muestra sanguínea, la cual su suero fue examinado mediante de la prueba Rosa de Bengala (RB) y validadas a través de la prueba de Fluorescencia Polarizada (“FPA”). la cual mostro datos de una prevalencia de brucella de 7.10 % (27/380 animales). Además, explico que los principales factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina son: origen externo de animales de remplazo, la presencia de otras especies animales, la presencia de abortos, no tratamiento de los restos de los abortos, venta de animales enfermos y la no revisión de los abortos por un médico veterinario. También, no encontraron factores de riesgo asociados a: alquiler de potreros, la vacunación, sistemas reproductivos empleados, y el conocimiento de la enfermedad.

Ochoa (2018), realizo su investigacion en la Finca El Limón, perteneciente a la provincia de El Oro, cantón Las Lajas, parroquia La Victoria, el objeto fue establecer la prevalencia de *Brucella abortus*, en la cual se tomó en cuenta a 300 hembras bovinas en etapa de reproducción. Para lo cual se tomó en cuenta edad, raza y sexo de los animales, se analizaron las variables presencia o no presencia de problemas como abortos o infertilidad. Para lo cual empleo un diseño totalmente dirigido, en lo cual el 100% de la población muestreada dio como resultado negativo a brucelosis bovina tomando en cuenta que se había presentado tres casos anteriores de abortos en la propiedad, lo cual determino que la prevalencia de la enfermedad es del 0% y no representa un riesgo sanitario o alimentario.

Tomando en cuenta el criterio de Rosero, Rosales, Benavides, Cortez, & Cevallos (2018), realizaron una investigación en la provincia del Carchi - Ecuador, donde evaluaron comparativamente la prueba de Fluorescencia Polarizada (FPA) como prueba confirmatoria para la brucelosis bovina comparándola con la prueba de Elisa competitiva, prueba recomendada para el diagnóstico confirmatorio en el Programa Nacional de Control de la brucelosis bovina en el Ecuador. El estudio se realizó en 1000 hembras bovinas mayores a dos años sin un estado sanitario conocido, pertenecientes a 94 Unidades Productivas Agropecuarias. En la cual se utilizó la prueba rosa de bengala para analizar los sueros sanguíneos. Además, se empleó la prueba cELISA para los casos positivos, y luego cotejados con los resultados de la FPA considerando como punto de corte para esta última ≥ 89.9 mP.

Mediante distribución de frecuencias se estableció que del total de 1000 muestras analizadas con RB, 94 resultaron positivas. Las cuales fueron analizadas con cELISA y FPA de las cuales 77 resultaron positivas. Asimismo 11 muestras que resultaron positivas a RB y cELISA fueron negativas a FPA. Además 6 muestras positivas a RB fueron clasificadas como negativas tanto a cELISA como a FPA. Para el análisis de concordancia se utilizó el coeficiente Kappa el cual permitió observar una moderada concordancia entre las pruebas de cELISA y la FPA con un índice de 0,472 (IC 95% 0.179 – 0.765) entre las dos pruebas.

Según como afirma Cortez (2018), donde realizó la validación de dos pruebas serológicas tamiz Rosa de Bengala y Aglutinación Lenta en Tubo también la variante de Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 mercaptoetanol para realizar el análisis de *Brucella abortus* en bovinos inmunizados con cepa 19 en la provincia del Carchi”, donde se examinaron 117 sueros bovinos con estatus sanitario y de vacunación conocidos, Los resultados obtenidos para la sensibilidad y especificidad de las pruebas fue: 100% y 59,4% (RB), 100% y 67,6% (“SAT”), 88,9% y 68,5% (“SAT-2Me”), respectivamente. A través del análisis de Curva Operativa del Receptor (ROC) se determinó que la prueba que mejor área bajo la curva obtuvo fue la prueba “SAT” con un valor de 83,8% y IC 95%, seguido de la prueba RB con 74,5% y IC 95%, y finalmente la prueba “SAT-2Me” con un 73,1% (IC 95%).

Desde el punto de vista de Abramonte (2019), la *brucella abortus* en Perú se encuentra bajo control y erradicación epidemiológica, el diagnóstico de la enfermedad se realiza a través de la prueba de tamiz Rosa de Bengala, además se utilizó los test de Elisa Competitivo y de Fijación del Complemento como pruebas confirmatorias, a través de las cuales se determina la prevalencia de la enfermedad, el estudio se realizó en la jurisdicción de Puente Piedra provincia de Lima – 2019, la cual cuenta con un estimado de 4075 animales bovinos, en la cual se seleccionó al azar 351 animales, de 16 hatos ganaderos, en los cuales se les tomó una muestra de sangre de la vena coccígea ubicada en la parte inferior central de la cola, las cuales fueron analizadas mediante la prueba de rosa de bengala; obteniendo como resultado cero animales positivos a la prueba Rosa de Bengala; obteniendo su prevalencia igual a 0%.

Teniendo en cuenta a Cordova (2019), donde realizó una investigación para determinar la seroprevalencia de brucelosis bovina en 5 hatos ganaderos de Tournavista, Huánuco, para su

estudio analizo 976 muestras de sangre de animales bovinos, para el análisis de las muestras empleo la técnica de aglutinación por Rosa de Bengala para la detección de anticuerpos de la enfermedad; los resultados fueron confirmados a través de la prueba de Elisa.

Obteniendo como resultados un valor de prevalencia de *Brucella abortus* para la prueba de Rosa de Bengala de 14.75% y ELISA de 13.93%. los resultados fueron obtenidos a través del programa de simulación @Risk también se empleó la fórmula de la prevalencia para obtener datos reales de sensibilidad y especificidad para las pruebas de Rosa de Bengala y ELISA, con un valor de 14.98%. obteniendo una asociación significativa ($p < 0.05$) entre la seropositividad frente a hatos ganaderos y categoría zootécnica. Lo cual concluyeron que la prevalencia de la *brucella abortus* en Tournavista, Huánuco es muy alta y se debe implementar inmediatamente el programa de control y erradicación de la enfermedad para así evitar su diseminación y afectaciones a otras especies o personas que puedan consumir productos derivados lácteos.

De acuerdo con Julio (2019), realizó un estudio el cual tuvo como objeto establecer la prevalencia y los factores de riesgo de la *brucella abortus* debido a la existencia de la enfermedad en los hatos ganaderos de la provincia de Imbabura que suministran leche a la empresa Floralp S.A. Para lo cual se utilizó la Prueba de Fluorescencia Polarizada en leche de tanque, debido a su alta sensibilidad y especificidad, como prueba de tamizaje a la cual resultaron dos unidades productoras agropecuarias como positivas, lo cual equivale a una prevalencia de 4,44%. Las UPAS 109 y 173 que resultaron positivas, se realizó un muestreo a todos los animales en producción y se les aplico la prueba Rosa de Bengala, subsiguientemente a las muestras que resultaron positivas fueron analizadas mediante la prueba de ELISA competitivo como prueba confirmatoria.

La prevalencia por cada UPA fue de 10% y 15,79%, respectivamente. Además, describió algunos de los posibles factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad como son; falta de medidas de bioseguridad e higiene y limpieza de parideras, terneros débiles, malos procesos de cuarentena, poca realización de pruebas diagnósticas, problemas de metritis y la procedencia de animales de remplazo en los hatos ganaderos.

Como señala Obregón (2020), donde su investigación tuvo como objetivo determinar los factores de riesgo asociados a casos positivos a *Brucelosis* bovina en hatos ganaderos de la zona de Putumayo, Colombia. En el cual aplico una investigación retrospectiva de casos,

controles y entrevistas a 90 productores distribuidos de la siguiente forma: 30 predios con historial de presencia de *Brucella abortus*, 30 hatos libres de *brucella abortus* y los 30 hatos que nunca se ha realizado análisis de diagnóstico para la enfermedad. además, se realizó una entrevista epidemiológica a los productores, el cual tuvo como objetivo indagar cuales son los factores más predominantes que tienen los bovinos para infectarse de la enfermedad. también, se analizó la frecuencia de presencia de la enfermedad en investigaciones anteriores en hatos ganaderos de la zona del Putumayo, para lo cual se tomó en cuenta datos del historial de diagnóstico de brucella abortus desde el año 2011- 2018, para lo cual fue solicitada la base de datos del Instituto Colombiano Agropecuario.

También se realizó una investigación de análisis de la frecuencia de anticuerpos anti-Brucella en hatos ganaderos expuestos, no expuestos y estatus sanitario desconocido, a la cual se les aplico el test de rosa de bengala como prueba primaria, Fluorescencia Polarizada, Elisa Competitiva como pruebas confirmatorias a la enfermedad. Los datos obtenidos fueron analizados mediante los programas estadísticos SPSS versión 25, @Risk, Easy Fit, Best Fit, Stat Fit, Xls tat, Stat graphics versión 16, Ncss y Excel. De los cuales, de los datos obtenidos información que fue verificada y consolidada por el ICA se pudo determinar 100 animales como positivos a la enfermedad, confirmado por Elisa competitiva. Además de los 90 predios que fueron realizado el diagnóstico y muestreo serológico, al momento de realizar la encuesta se pudo evidenciar 7 hembras bovinas positivas a la enfermedad, distribuidas en 4 hatos diferentes, según esto sería un dato relativamente bajo; no obstante, al comparar el número de casos positivos reportados durante los años desde 2011 – 2018 en el cual examinaron 26.740 animales, en el cual se obtuvieron 100 animales positivos, lo cual se determinó un 0.37% y 0,5 para el estudio.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1 Importancia de la brucelosis

La brucelosis es una de las zoonosis más permanentes en todo el mundo, causada por especies del género *Brucella*. Tal como lo menciona OIE, (2021) generando grandes problemas económicos en las etapas de producción y reproducción, esta enfermedad cuenta con una amplia cantidad de hospederos, que incluye: bovinos, caprinos, porcinos ovinos, perros, mamíferos marinos, roedores, el hombre y vida silvestre.

Rivera, Rueda, Calderon, Marino, & Gall (2003), mencionan que sus principales signos clínicos son: problemas de abortos, problemas placentarios, en los machos infección del epidídimo, inflamación de los testículos especialmente en países tropicales. Al ser humano puede transmitirse por el consumo de productos lácteos infectados mal pasteurizados en el caso de los veterinarios o cuidadores a través del contacto de restos de animales infectados con heridas abiertas o al momento de inseminar o aplicación de productos, los signos clínicos van desde personas asintomáticas, a casos de fiebre ondulante, sudoraciones, pérdida de apetito y dolores de cabeza, otro tipo de afectaciones son muy pocas probables (CFSPH, 2018).

La brucelosis animal genera grandes pérdidas a nivel económico en todo el mundo; en los países Latinoamericanos fue estimada en alrededor de 600 millones de dólares EE. UU por año (Acha & Szyfres, 2001). En Ecuador el Ministerio de Agricultura y Ganadería y el Servicio Ecuatoriano de Sanidad Ganadera. Estimo las pérdidas económicas en alrededor de US \$ 2,5 millones, el tratamiento de brucelosis para personas infectadas fueron estimadas por Gil y Samartino (2000), en aproximadamente US \$ 340 por paciente, en casos graves llegando a un valor de US \$4095 por paciente.

La brucelosis a pesar de estar erradicada y controlada en varios países desarrollados debido a medidas de control eficaces, la brucelosis subsiste endémicamente en muchos lugares del mundo, incluyendo la cuenca del Mediterráneo, América Latina, el Medio Oriente, partes de Asia occidental y de África (Memish & Balkhy, 2004).

Los factores de riesgo a los cuales la brucelosis bovina (*Brucella abortus*) está relacionada con su etapa de inicio, transmisión y subsistencia es en función a un determinado grupo de factores que van de la mano del número de animales, el tipo de manejo los hatos ganaderos y la características biológicas de la enfermedad, además otros factores de riesgo asociados son el contacto directo entre diferentes especies animales, también otro factor de riesgo está relacionado con el número de animales que se maneja en los hatos ganaderos, además al ser una enfermedad de carácter zoonótica el ser humano en el caso de los veterinarios pueden contraer la enfermedad por contacto directo con heridas abiertas en el momento de realizar procesos de inseminación artificial o aplicar productos sin las debidas medidas de seguridad, también se pueden infectar al consumir leche o productos derivados sin haber pasado por un correcto procesamiento de pasteurización (Chavisnan, 2018).

2.2.2 Situación Brucelosis en el mundo y distribución

La brucelosis sus porcentajes de prevalencia e incidencia varían mucho entre un país y otro y entre zonas de un mismo país. *Brucella abortus* es la especie más encontrada en los hatos ganaderos, a pesar de estar erradicada en los países desarrollados como; Canadá, Australia, Dinamarca, Países Bajos, Finlandia, Nueva Zelanda, Reino Unido, Noruega, Suecia, Alemania, Bélgica, Rumanía y otros países, en muchas partes del mundo, como Oriente Medio, América Latina, el sur de Europa, partes de Asia occidental y África la enfermedad sigue siendo endémica (Memish & Balkhy, 2004).

La *Brucella melitensis*, que está presente en casi todos los lugares donde se crían cabras y ovejas, sigue siendo el agente más significativo en el sureste y centro de Europa. En Croacia existe evidencia de brucelosis en cerdos. En Oriente Medio, el género *B. melitensis* es comúnmente prevalente entre las cabras y ovejas.; no obstante, en el ganado vacuno la incidencia de brucelosis parece estar aumentando. En África, la prevalencia de brucella animal está mal estimada o se desconoce por completo. En América Central y el Caribe, las tasas de infección suelen oscilar entre el 10% y el 25%, donde El Salvador presenta la menor incidencia (1%) y Guatemala y Costa Rica parecen ser los más altos. En Sudamérica, la brucelosis es la enfermedad más grave en el ganado vacuno, con tasas de prevalencia que oscilan entre el 0,1% y el 20,3%, siendo *B. abortus* el agente más común en Argentina y Perú, *B. melitensis* y *B. suis* también están presentes en tasas elevadas (Acha & Szyfres, 2001).

2.2.2.1 La brucelosis animal en Ecuador

El Ecuador es un país endémico para la enfermedad, según estudios realizados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería en el año 1999 el Ecuador fue dividido en Regiones epidemiológicas que presentan la enfermedad quedando las provincias de la costa y sierra norte como región de alta prevalencia con valores del 4% al 10,62 % y la provincias de la amazonia y sierra sur como región de bajas prevalencia con valores de 1.2% y 2,6% y Galápagos como libre de *Brucella Abortus* , este es el único estudio existente a nivel nacional aunque existen investigaciones a nivel local (Ron, 2003).

En el Ecuador existen informes oficiales del año de 1990-2008 donde estimaron una prevalencia de la enfermedad en humanos con un porcentaje de 0,21 casos por cada 100.000 habitantes y en los años de 2006 y 2015 se registraron 6.806 casos de *Brucella Abortus* encontrándose en la provincia de Pichincha y Carchi con 2207 y 993 casos respectivamente (Morales & Morillo, 2020).

2.2.2.2 La Brucelosis en la Provincia del Carchi

La provincia del Carchi cuenta con una gran producción lechera, pero sin embargo no hay que desconocer la alta prevalencia de la enfermedad en la provincia con valores que van desde 1,97% -10,62%, esto debido al desconocimiento de la enfermedad, poca o nulas condiciones sanitarias vacunación, procesos de cuarentena, eliminación correcta de restos de abortos etc. además de no contar con un correcto seguimiento epidemiológico por parte de las instituciones gubernamentales encargadas del control sanitario y bienestar animal en el país (Chavisnan, 2018).

2.2.3. Etiología

La principal causa de la brucelosis en ganado bovino, búfalos y bisontes es el género *Brucella abortus*, es un bacilo patógeno intracelular facultativo corto Gram negativo: En el ganado bovino existen otras especies no asociadas comúnmente como son: *Brucella melitensis* y *B. suis*. Existen seis especies conocidas: *B. suis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, que son cepas lisas y *B. canis*, *B. ovis*, que son cepas rugosas, En mamíferos marinos se encuentra géneros de brucella como: *B. pinnipediae* en pinnípedos y *B. cetaceae* en cetáceos. En ocasiones estas dos últimas especies son agrupados en un solo género, *B. maris* (Guamán, 2017).

El género brucella es un tipo de bacteria compuesta por cocobacilos inmóviles, aeróbicos que no presentan esporas mucho menos capsulas, habitualmente se desarrollan en grupos pequeños y en el mayor de los casos aislados, se caracterizan por ser microorganismos gran negativos su medida está determinada desde 0.4 a 0.8 x 0.4 a 2.5 μ considerándose como una de las más pequeñas dentro del género brucella spp. Además, este género de *Brucella abortus* como se muestra en la Figura 1 es una bacteria intracelular facultativa, es decir que crece y se mantiene en los macrófagos y células epiteliales (Guamán, 2017).

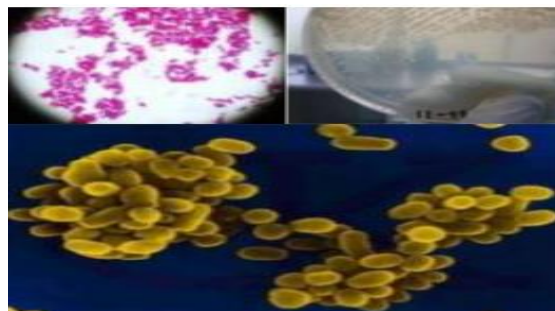


Figura 1: Etiología de *Brucella Abortus*

2.2.4. Transmisión y propagación de la enfermedad

La brucelosis entre su principal fuente de transmisión es en el momento del parto o en casos de abortos, debido a que en los líquidos de partos existe una gran cantidad de bacterias que logran sobrevivir por un tiempo prolongado en el ambiente externo en condiciones húmedas o de frío siendo infecciosas para otros animales, al ingerirlas, a través del pasto o lamer estos restos. Además la brucelosis bovina se encuentra presente en la leche, orina, heces y semen la liberación de restos de brucella a través de estos medios puede ser de manera continua, prolongada o permanente causando que muchas vacas infectadas sean crónicas a la infección, otra forma de infección que se ha mencionado es a través de la inseminación artificial por medio de semen contaminado de la enfermedad al momento de colocar el semen en el útero aunque esto se considera muy poco probable, también, se puede contagiar a los humanos por contacto directo con heridas abiertas o el consumo de productos contaminados. También existe evidencia de brucelosis en especies de fauna salvaje y en algunas especies marinas (OIE, 2021).

2.2.5. Signos y síntomas

Los animales enfermos no presentan signos clínicos es decir son asintomáticos, en las hembras hasta el momento de la gestación el síntoma más predominante es el aborto, presentándose en algunas hembras en el último tercio de gestación con retención de placenta, siendo más altamente susceptibles las vacas en gestación no vacunadas, en algunos casos se llega a cumplir el periodo de gestación completo presentándose el nacimiento o término de terneros muertos o débiles. Además, otras consecuencias adicionales son la metritis, orquitis llegando a cuásar una infertilidad permanente, además se pueden presentar casos de higromas en las articulaciones de las patas, también se estima que la infección ocasiona pérdidas de 20 % a 25% en la producción de leche como se observa en la Figura 2 (OIE, 2021).

La brucelosis por su característica zoonótica también afecta al ser humano, aunque la mayor parte no presentan cuadros clínicos lo cual se convierte en una infección debilitante del bienestar humano pasando a ser confundida con otro tipo de infecciones. En su etapa más avanzada o de mayor sintomatología se puede presentar fuertes fiebres recurrentes acompañada de sudoraciones excesivas en las noches y con fuertes dolores de las articulaciones, además durante su etapa de infección de la enfermedad otros problemas a la salud humana como son orquitis y epididimitis en hombres. También algunas investigaciones afirman que esta zoonosis es de gran importancia debido a los daños que puede llegar a causar a nivel de sistema nervioso central, además puede presentarse problemas cardiacos como la endocarditis (infección al revestimiento interno y válvulas cardiacas) esto a largo plazo puede derivarse a una enfermedad crónica (OIE, 2021).



Figura 2:Signos y Síntomas de *Brucella Abortus*

2.2.6. Respuestas Inmunes

Las infecciones por brucelosis suelen dar lugar a respuestas inmunitarias tanto por células mediadoras como humorales, que son activados principalmente por OPS de la superficie celular de *Brucella*. La duración y la magnitud de estas respuestas depende de varios factores tales como: número de exposición, virulencia del agente, sexo, edad, estado de gestación, especie animal y exposición previa a los antígenos de *Brucella* (Estein, 2006).

La principal línea de defensa del huésped contra los organismos de *Brucella* son los macrófagos activados y los leucocitos polimorfonucleares, que migran al sitio de la invasión bacteriana. Poco después de la invasión de *Brucella* spp., La destrucción extracelular es realizada por anticuerpos especialmente inmunoglobulina M, seguidamente por IgG1 que pronto excede la cantidad de IgM, y luego por pequeñas cantidades de IgG2 e IgA. Como *Brucella* spp. son esencialmente patógenos intracelulares, los Ab por sí solos no son muy protectores, razón por la cual, las respuestas inmunes mediadas por células son más importantes que las respuestas humorales (Estein, 2006).

2.2.7. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la brucelosis bovina, se utiliza como pruebas de tamizaje, las pruebas de anillo en leche y la prueba de aglutinación Card-test en placa Rosa de Bengala en suero sanguíneo, y como pruebas confirmatorias la prueba serológica de ELISA Competitiva, “FPA” u otras pruebas que puedan ser autorizadas por la OIE (AGROCALIDAD, 2008).

2.2.7.1. Diagnóstico Clínico

Ante la presencia de signos clínicos como abortos en unidades productoras Agropecuarias, para su confirmación se requiere de pruebas serológicas, además pruebas de laboratorio prescritas para aislar e identificar a la bacteria, conforme a las normas sobre métodos y valores umbral de diagnóstico que figuran en Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (AGROCALIDAD, 2008).

2.2.7.2. Pruebas de Diagnóstico Directo

2.2.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta prueba sirve para reducir los porcentajes asociados a falsos positivos en pruebas serológicas, problemas de peligrosidad y demora inherentes al aislamiento de organismos de *Brucella*. Se caracteriza por ser una técnica rápida y confiable basada en ADN. Dentro del género *brucella* la hibridación permite diferenciar entre especies y bio variedades, y puede ser utilizada individualmente o complementaria a otras pruebas serológicas. La prueba PCR en tiempo real, es más sensible, rápida y precisa a diferencia de los ensayos convencionales de PCR. Es una técnica automatizada y de amplificación de los productos de PCR que es monitoreado cuantitativamente a medida que se acumulan durante el ciclo térmico, evitando así la que se manipule los productos de PCR (Montes, 2019).

2.2.7.4. Pruebas de diagnóstico de cultivo:

Es una prueba que se obtiene por cultivo de médula ósea o hemocultivo y, muy ocasionalmente, por medio de cultivo de líquido articular, cefalorraquídeo, exudado purulento, etc. En los procesos agudos, luego de incubar el medio por 2-4 días, se puede observar en la etapa sólida pequeñas cantidades de colonias que se desplazan por el agar. Muy escasa vez puede presentarse el crecimiento desde 5-15 días, En los procesos agudos de manera excepcional, puede retrasarse entre los 30-45 días, cuando se realiza la extracción de hemocultivos en etapa afebril, el aislamiento oscila en porcentajes entre el 90-95% de los casos. En casos de reinfección o fracaso terapéutico el porcentaje no superar el 60% (Montes, 2019).

2.2.8. Pruebas de diagnóstico Indirecto.

2.2.8.1. Prueba de anillo en leche:

La Prueba de Anillo en Leche pertenece a la categoría de pruebas indirectas utilizadas para el diagnóstico presuntivo de *brucella* bovina, dado que evidencia anticuerpos aglutinantes de anti-brúcela frente a la fracción O de la cadena de lipopolisacáridos de la membrana externa del agente etiológico, tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 56 % aunque la OIE

en la quinta edición de su manual Pruebas de Diagnóstico y de Vacunas para Animales Terrestres mamíferos, Aves y Abejas, nos indica que esta es una técnica muy útil para la detección de brucella en bovinos pero muy poca efectiva en especies menores (Acosta & Ortiz, 2010).

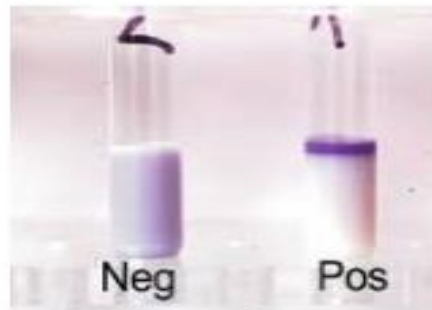


Figura 3: Prueba de Anillo en leche

2.2.8.2 Prueba de Fijación del Complemento:

Esta prueba es utilizada y aceptada ampliamente como técnica confirmatoria debido a su capacidad para detectar las pruebas de animales infectados que dan títulos bajos en pruebas de aglutinación como la rosa de bengala, La prueba de fijación del complemento se basa en que la IgG1 contra brucelosis presente en el suero se acoplará al AG célula entera que activará la lisis de los eritrocitos; la prueba de fijación del complemento tiene una alta superioridad a las técnicas de aglutinación debido a su alta especificidad de 100% y 98%, aplicada en animales vacunados con S19 y animales no vacunados respectivamente; La prueba de fijación del complemento es muy compleja de realizar se requiere de un número importante de reactivos, controles sumado a la importancia de personal capacitado y buenas instalaciones del laboratorio (Andrade & Morera, 2014).

2.2.8.3 Prueba de Elisa Inmunoenzimatica Indirecta (ELISA-i):

La prueba de iELISA es una técnica indirecta que es capaz de detectar los anticuerpos contra Brucella, se utiliza como antígeno S-LPS purificado y un anti-IgG específico. La especificidad y la sensibilidad en valores medios de iELISA-EDTA son 95,8% y 98,2%, respectivamente, según muestras de UPAS libres de brucella, de bovinos infectados naturalmente y vacunados. Una desventaja del iELISA es que no logra diferenciar animales vacunados con *B. abortus* S19 de los infectados con cepas patógenas (Muñoz, 2020).

2.2.8.4. Prueba de Elisa competitiva (c-ELISA):

La prueba de C-ELISA es una técnica directa que nos permite distinguir los anticuerpos vacunales de los producidos por la infección natural. Esta prueba utiliza el Anticuerpo monoclonal M-84 específico para la cadena “O” del polisacárido, se basa en la detección de la reacción antígeno – anticuerpo obteniendo como resultado el producto que puede ser cuantificado a través de medidores enzimáticos, el proceso consiste en aplicar en las plaquillas el suero en el antígeno inmovilizado los cuales se unirán a una enzima la cual logra modificar el sustrato en presencia de un cromógeno lo cual provoca un cambio de color que es detectado por el equipo de espectrofotómetro (Muñoz, 2020).



Figura 4:Prueba de Elisa Competitiva

2.2.8.5 Rosa de Bengala:

Utiliza como antígeno una suspensión bacteriana a la que se añade el colorante rosa de bengala, enfrentándola al suero sin diluir del animal enfermo. Proporciona una aproximación diagnóstica en pocos minutos con una sensibilidad y especificidad muy altas. Presenta elevado grado de correlación con la seroaglutinación y, por su simplicidad, es muy útil como prueba de despistaje inicial o screening. Sus falsos negativos se limitan a animales enfermos con procesos de pocos días de evolución y a algunos casos de enfermedad de curso muy prolongado (Acosta & Ortiz, 2010).

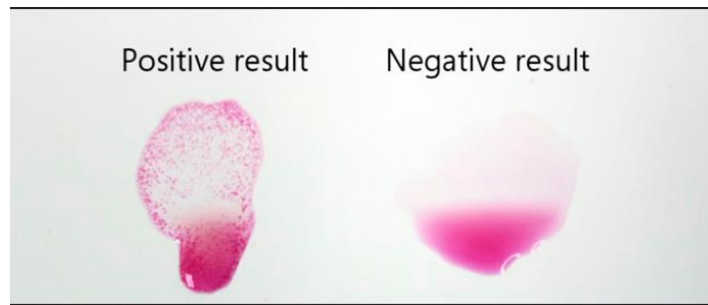


Figura 5: Prueba de Rosa de Bengala

2.2.8.6. Prueba de Fluorescencia Polarizada (“FPA”)

La FPA es una prueba de diagnóstico fundamentada en la emisión de luz polarizada que detecta las partículas presentes en la muestra de estudio, permitiendo tener resultados rápidos. Se basa en función al tamaño de las partículas en rotación, el tamaño depende de la habilidad del anticuerpo de reaccionar con el antígeno. Es una técnica que de igual forma que cELISA nos permite discriminar animales vacunados con S19 y aquellos infectados de forma natural además que posee características de sensibilidad 98.70 % y especificidad de 99,80 % (Rosero, Rosales, Benavides, Cortez, & Cevallos, 2018). Esta técnica es ampliamente utilizada en los programas certificación y control de brucelosis en Europa y América del Norte. Esta prueba está considerada como prescrita para el comercio por la organización de salud animal (OIE) (Cevallos, 2018).

La principal ventaja de FPA se basa que se la puede realizar casi en cualquier lugar debido a su proceso simple y rápido sin procesos repetitivos en relación a test como los de cero aglutinaciones o Elisa competitivo (Cevallos, 2018).



Figura 6: Prueba FPA

2.2.9. Prevención y control

Una manera muy efectiva para lograr prevenir y controlar la enfermedad y así lograr explotaciones ganaderas libres de la brucelosis bovina es teniendo buena capacitación y conocimiento de la enfermedad, todo esto llevado de cumplir con buenos protocolos sanidad animal donde se incluya procesos de vacunación, buen manejo sanitario de las UPAs, además de procesos de diagnóstico temprano de la enfermedad logrando así evitar que la enfermedad se disemine afectando a más animales o representando un riesgo a la salud humana por el consumo se pueda llegar a tener de sus productos derivados.

Los principales motivos para implementar procesos de control, erradicación y prevención de la brucelosis son las pérdidas económicas generadas y los problemas a la salud pública. La principal forma de prevenir la brucelosis humana es implementar procesos efectivos de control y erradicación de la infección en animales. El método a implementar para control y erradicación de brucelosis está relacionada a la prevalencia existentes en las especies animales, los recursos económicos y de insumos o materiales disponibles y la eficacia de los programas de sanidad animal.

A nivel mundial se han realizado recomendaciones como manejar programas vacunación masiva como medida eficaz cuando los niveles de prevalencia de la enfermedad son altos; si la prevalencia es baja el manejo de pruebas serológicas repetidas y el sacrificio de los animales seropositivos pueden ser empleados solos o en combinación con medidas de higiene y vacunación. Se deben tomar medidas preventivas para erradicar la enfermedad debido a su carácter zoonótico y de difícil control (Acha & Szyfres, 2001).

En Ecuador el SESA desarrollo un proyecto en las distintas áreas epidemiológicas que intenta disminuir el porcentaje de animales infectados, de brucelosis y alcanzar condiciones operativas, e iniciar con procesos de control y la erradicación (Cevallos, 2018).

2.2.9.1 Vacunación

Todos los ganaderos en sus hatos de producción deben mantener un calendario de vacunación. En el cual se debe aplicar en hembras desde los tres meses de hasta los seis meses de edad. En

Ecuador las vacunas S19 y RB 51 se encuentran registradas por Agrocalidad de la cual la S19 es de dosis única mientras la RB51 necesita de revacunación (AGROCALIDAD, 2008).

2.2.9.2. La vacuna S19

La vacuna S19 o cepa 19 se caracteriza por ser una vacuna viva, atenuada aislada en 1930 por el Dr. John M Buck como cepa virulenta de Brucella de morfología lisa a partir de leche de vaca. Esta vacuna tiene una baja patogenicidad, es utilizada por tener una buena inmunogenicidad y una alta antigenicidad otorgando una alta protección en el ganado su eficacia depende de la edad de vacunación, vía de inoculación dosis, entre otras. Sin embargo, una desventaja es la generación de anticuerpos en hembras vacunales lo cual interfiere en las pruebas diagnósticas que emplean antígenos de reacción polisacárida, esta vacuna es ampliamente utilizada en los programas de prevención y erradicación de brucelosis bovina, esta vacuna comercialmente se encuentra disponible en forma liofilizada y en dosis de 2 ml (AGROCALIDAD, 2008).

2.2.9.3. La vacuna RB-51

Esta vacuna fue aislada mediante fases repetidas de lisa virulenta S-2308, para obtener la mutante RB-51 de brucelosis abortus, es una cepa rugosa estable, no expresa nada o mínimas cantidades, de la cadena lateral "O". del lipopolisacárido con esta vacuna el ganado permanece seronegativo a las pruebas convencionales de diagnóstico, la dosis administrada es 2 ml a hembras bovinas sin restricción de edad vía subcutánea, su principal desventaja es que se debe revacunar y el alto costo por dosis. (AGROCALIDAD, 2008)

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

El enfoque es cuantitativo, debido a que se realizó la recolección de datos numéricos y porque se utiliza análisis estadísticos para aceptar u objetar la hipótesis planteada acerca de la evaluación de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche “FPA”.

3.1.2. Tipo de Investigación

3.1.2.1 Exploratoria

Esta es una investigación de carácter exploratoria debido a que se trabajó en base a información bibliográfica y trabajo de campo donde se recogió muestras de sangre y leche de bovinos para determinar la presencia de brucelosis utilizando la prueba de Rosa de Bengala (RB), ELISA competitivo (cELISA) y Fluorescencia Polarizada en leche (FPA), en UPAs de la provincia del Carchi.

3.2. HIPÓTESIS O IDEA A DEFENDER

H1. La prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” es efectiva para el diagnóstico de brucelosis bovina en leche en relación a pruebas diagnósticas confirmatorias en sangre.

H0. La prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” NO es efectiva para el diagnóstico de brucelosis bovina en leche en relación a pruebas diagnósticas confirmatorias en sangre.

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1. Operacionalización de variables

Hipótesis	Variable	Definición conceptual de la variable	Dimensión	Indicadores	Técnica	Instrumento
La prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” será efectiva en la evaluación de brucelosis bovina.	V.I Manejo de las upas bovinas en los hatos lecheros y las vacunas	Practicadas realizadas al momento de manejo nutricionales o vacunas de los animales	¿Cómo es el manejo de los hatos ganaderos?	Especies de animales. Vacunación Lactancia	Entrevista	Cuestionario
	V.D La sensibilidad y especificidad de la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA”.	La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. la especificidad es la capacidad para detectar a los sanos	¿Qué factores de riesgo inciden en la prevalencia de Brucelosis bovina?	1. Vacunación 2. Aborto 3. Número de partos 4. Sistema de reproducción 5. Sistema de producción	Observación Muestreo	Pruebas: fluorescencia polarizada y rosa de bengala Cuestionario

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

3.4.1 Procedimentales

La presente investigación se realizó en dos fases una de campo y otra de laboratorio que permitieron cumplir con el objetivo propuesto que es evaluar la prueba FPA en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina en la provincia del Carchi.

3.4.1.1 Fase de Campo

La fase de campo inició con la socialización del proyecto, para lo cual se contactó a representantes de asociaciones ganaderas de la Provincia del Carchi, en comunidades del cantón Tulcán como Chauchin, La Modelo, Guamag, Chulamuez, Tanyapud, Las Peñas, La Delicia, Tufiño, Cofradía, Guagua Negro, Julio Andrade, El Carmelo, Urbina, Urbina Llano, en el cantón Mira, El Hato y en el cantón Montúfar, Cristóbal Colon, donde se explicó el esquema de muestreo a realizar tanto a nivel de UPAs como de bovinos.

El muestreo en campo inicio con la toma de muestras de leche de cada UPA, utilizando un frasco estéril de 50ml, mismo que fue refrigerado y transportado al laboratorio de diagnóstico veterinario de la UPEC para realizar la prueba FPA. Posterior a ello se realizó en conjunto con los ganaderos una planificación del muestreo sanguíneo de los bovinos lactantes que aportaron leche para el diagnóstico FPA. La toma de muestra sanguínea se realizó de la vena coccígea que se encuentra ubicada en la parte central inferior de la cola de los bovinos, utilizando un tubo con gel separador de 5ml para vacutianer®. Las muestras sanguíneas fueron de igual forma refrigeradas y transportadas al laboratorio de diagnóstico veterinario de la UPEC para realizar la prueba RB y cELISA.

3.4.1.2 Laboratorio

Luego de obtener las muestras de leche y sangre en campo se realizó el análisis en el laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC) donde se utilizó la prueba FPA en leche a nivel de UPAs. Luego se realizó la prueba RB en suero sanguíneo. Además, se utilizó la prueba de Elisa Competitivo (cELISA) como prueba

confirmatoria a los resultados positivos obtenidos por los test antes mencionados. Los protocolos utilizados se indican a continuación:

3.4.1.2.1 Prueba del Rosa de Bengala

La prueba de diagnóstico RB, es una prueba sencilla de aglutinación que usa el antígeno tamponado a pH bajo, normalmente $3,65 \pm 0,05$. El antígeno utilizado es una suspensión de *Brucella abortus* cepa 99 of “Weybridge” inactivada por temperatura y fenol coloreada con Rosa de Bengala de la casa comercial IDEXX. La prueba requiere que el suero de los animales y el antígeno se encuentren a temperatura ambiente y sean homogenizados previo a su uso. Para la prueba se colocó 30 μ l de cada muestra de suero en la placa de vidrio y se añadió 30 μ l de antígeno junto a cada muestra, luego se mezcla el suero y el antígeno usando una varilla de plástico para cada prueba hasta obtener una zona circular de aproximadamente 2 cm, a continuación, la placa fue agitada mediante movimientos ligeros circulares por 4 minutos. Luego de transcurrido los 4 minutos que establece el protocolo de la prueba se realizó la comprobación o lectura de las muestras considerando como Positivas aquellas muestras que forman grumos, hay que evitar confundirlas con impurezas, residuos o hemolisis. Se considero como Negativas las muestra que entre suero y antígeno es homogénea y sin presencia de grumos (Ron, 2003).

3.4.1.2.2 Prueba de Florescencia Polarizada “FPA”

La prueba de fluorescencia polarizada se realizó siguiendo las especificaciones del kit comercial “Brucella Antibody Test Kit FPA” de la casa Ellie. Para la preparación de las muestras se añadió 1,5 ml de leche en tubos eppendorf y se centrifugó por 5 minutos a 10000g. Se tomó 1 ml de la leche desnatada obtenida de la centrifugación y se traspasó a otro tubo eppendorf en el que se agregó 60 μ l de ClearMilk Buffer, dejando incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de este periodo, se añadió 300 μ l de diluyente de muestras sobre la parte superior del coágulo y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 g, se tomó 1 ml de suero de leche en un tubo de boro-silicato y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Los controles se prepararon con 500 ul de agua destilada y 500 ul del diluyente de muestra. Se tomaron lecturas en blanco de controles y muestras, y se agregó 10 ul del antígeno con fluorescencia en todos los tubos dejando incubar por 5 minutos, para luego obtener las lecturas de mili-polarización tanto de controles y muestras.

Se calculo los valores de ΔmP para cada muestra, restando el mP medio del control negativo del mP de la muestra. Los resultados de la prueba se interpretaron de acuerdo con la siguiente tabla 2:

$$\Delta mP = (\text{muestra mP} - \text{Avg Neg Control mP})$$

Negativo: ≤ 10	Positivo: ≥ 10
---------------------	---------------------

Tabla 2. Indicador

3.4.2.3 Prueba de Elisa Competitivo

A fin de confirmar los resultados positivos obtenidos en RB, se realizó la prueba de diagnóstico cELISA siguiendo las especificaciones indicadas en el Kit comercial “SVANOVIR® *Brucella-Ab C-ELISA*” de la casa *SVANOVA*. En este procedimiento, la muestra junto con un anticuerpo monoclonal de ratón específico para un epítipo en la porción O-polisacárido del antígeno S-LPS, se exponen a pocillos recubiertos con lipopolisacárido liso de *Brucella abortus* en placas de micro valoración. Si los anticuerpos de *Brucella* están presentes en la muestra de prueba, se unirán a los antígenos en el pocillo y bloquearán estos sitios antigénicos. Si no hay anticuerpos de *Brucella* en la muestra, estos sitios permanecerán libres y el mAb que se agregó junto con la muestra se unirá a estos sitios antigénicos libres.

Después de un período de incubación, los materiales no unidos se eliminan mediante enjuague y se añade a la placa una IgG conjugada con peroxidasa de rábano picante anti ratón de cabra. El conjugado de HRP se unirá al mAb específico en ausencia de anticuerpos de *Brucella* en la muestra. Los elementos no unidos del conjugado se eliminan en la fase de lavado antes agregar el sustrato. Un resultado negativo está indicado por el desarrollo de un color azul. La reacción se detiene mediante la adición de una solución de parada, cambiando el color azul a amarillo.

El resultado se lee con un fotómetro de microplaca, donde la densidad óptica (OD) se mide a 450 nm. El dato obtenido permite determinar el porcentaje de inhibición, el cálculo se realizó considerando el promedio de los valores de densidad óptica de los sueros y los controles, utilizando la siguiente fórmula:

$$PI= 100 - \frac{(DO_{control} \times 100)}{DO_{Conjugado\ de\ control}}$$

Figura 7: Fórmula para cálculo densidad

En cuanto a la interpretación de resultados se tomó como resultados negativos a todos los valores de PI menores a 30% y positivo a los valores de PI mayores e iguales a 30%.

3.4.3. Análisis Estadístico

3.4.3.1 Prevalencia

La prevalencia es la proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento en un momento o en un período de tiempo determinado de una enfermedad, lo que viene a ser la proporción o números de casos, en una población muestreada. Para la determinación de la prevalencia se consideró la prueba FPA que es motivo de la presente investigación, y que permitirá determinar la prevalencia de brucelosis bovina en la provincia del Carchi a nivel de UPAs. Luego de obtener la información necesaria se determinará la prevalencia utilizando la fórmula propuesta por Fernández, Pértegas, & Valdés, (2004).

$$P = \frac{No\ DE\ CASOS\ CON\ LA\ ENFERMEDAD\ EN\ UN\ MOMENTO\ DADO}{TOTAL\ DE\ LA\ POBLACION\ EN\ ESE\ MOMENTO} \times 100$$

Figura 8: Fórmula de la prevalencia

3.4.3.2 Coeficiente kappa:

El coeficiente Kappa calcula el grado de concordancia de las evaluaciones nominales u ordinales realizadas por múltiples evaluadores cuando se evalúan las mismas muestras.

Estandarización de los observadores o método a través del cual se busca la concordancia entre observadores (Martínez, 2017).

El coeficiente Kappa utiliza valores de 0 a 1 para determinar el nivel de concordancia entre las observaciones, además que permite expresar dicho valor mediante características cualitativas como se indica en la tabla a continuación:

Tabla 3. Interpretación de resultados cualitativos del coeficiente Kappa

Coeficiente Kappa	Fuerza de Concordancia
0,00	Pobre
0,01 - 0,20	Leve
0,21 - 0,40	Aceptable
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Considerable
0,81 - 1,00	Casi perfecta

Para la comparación de las pruebas diagnósticas en estudio al presentar estos esquemas de diagnóstico diferentes, en virtud que el análisis mediante FPA en leche es a nivel de UPAs y las pruebas RB y cELISA son individuales por animal, se considerará el resultado de al menos un animal confirmado mediante la prueba cELISA para que esta UPA sea considerada como positiva.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

En la presente investigación se realizó el diagnóstico de brucelosis bovina a un total de 99 UPAs, a través de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche, y lográndose muestrear un total de 1668 animales a los que se realizó el diagnóstico usando la prueba RB como prueba de Tamiz y cELISA como prueba confirmatoria.

4.1.1 Comparación de las pruebas FPA en leche, Rb y cELISA

En la Tabla 2 se puede observar la comparación entre las pruebas con un total de 99 UPAs de las cuales 26 resultaron positivas a los tres test, además una fue positiva a FPA y negativa a RB y cELISA, también se puede observar dos positivas a RB, cELISA y negativa a FPA, Otro valor observado es 19 positivas a RB y negativas a FPA y cELISA, además de un total de 51 fueron negativas a las tres pruebas.

Tabla 4. Resultados obtenidos en la evaluación de las pruebas

Fluorescencia Polarizada (FPA)	Rosa Bengala (RB)	Elisa Competitiva (cELISA)	Total
+	+	+	26
+	-	-	1
-	+	+	2
-	+	-	19
-	-	-	51
+	+	-	0
		Total	99

4.1.2 Prevalencia de brucelosis bovina a nivel de UPAs

La prevalencia de la enfermedad, reportada empleando la prueba de diagnóstico de FPA en leche es de 27,27 %.

$$P = \frac{27}{99} \times 100 = 27,27\%$$

4.1.3 Concordancia FPA en Leche y RB

En la tabla 3 se puede observar que el coeficiente Kappa muestra una concordancia buena con un coeficiente de 0,608 - (0,450 – 0,767 IC 95%) entre la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche y Rosa de Bengala.

Tabla 5. Índice Kappa para brucelosis bovina FPA y Rosa de Bengala.

		Diagnóstico Brucelosis bovina		Total
		+	-	
Diagnóstico Brucelosis bovina	+	29	18	47
	-	1	51	52
Total		30	69	99

Coeficiente Kappa: 0,608
Concordancia cualitativa: Buena
Índice de confianza: 95% (0,450 – 0,767)

4.1.4 Concordancia FPA en leche y cELISA

En la Tabla 4 se puede observar que el coeficiente Kappa muestra una concordancia muy buena con un coeficiente de 0,854 - (0,740 – 0,967 IC 95%). entre Fluorescencia Polarizada en leche (FPA) y Elisa Competitivo (cELISA).

Tabla 6. Índice Kappa para brucelosis bovina FPA y cELISA.

		Diagnóstico Brucelosis Bovina		Total
		+	-	
Diagnóstico Brucelosis bovina	+	26	2	28
	-	4	67	71
Total		30	69	99

Coeficiente Kappa: 0,854
Concordancia cualitativa: Muy Buena
Índice de confianza: 95% (0,740 – 0,967)

4.2. DISCUSIÓN

En la presente investigación con el fin de correlacionar las pruebas en leche a nivel de UPAs con las pruebas en sangre individual de animales, se consideró para el caso leche UPAs positivas a la prueba FPA en leche, así como también se consideró como UPAs positivas a aquellas que presenten al menos un animal positivo a las pruebas serológicas en sangre; bajo el diseño antes mencionado se analizaron un total de 99 muestras de leche provenientes de 99 UPAs, de las cuales 26 fueron positivas en las tres pruebas diagnósticas utilizadas FPA en leche, RB, cELISA.

Esto se atribuye a que las tres pruebas tienen el mismo principio que es la detección de anticuerpos contra *Brucella spp* a través de las inmunoglobulinas tipo IGg, en un proceso de aglutinación utilizando una suspensión bacteriana y enfrentándola al suero sin diluir del animal muestreado en el caso de la prueba Rosa de Bengala, mientras que cELISA y FPA se basan en ensayos de unión primaria, FPA se fundamenta en la emisión de luz polarizada y detecta las partículas presentes en la muestra de estudio como lo mencionan Rosero, Rosales, Benavides, Cortez, & Cevallos, (2018). Además, existe una alta relación entre las pruebas debido a que tienen similares valores de sensibilidad y especificidad, como lo indica Praud, (2016). donde evaluó la sensibilidad y especificidad de estas pruebas en 5111 muestras de Unidades Productoras Agropecuarias, mostrando una sensibilidad para FPA de un 99%, en tanto que cELISA fue de 98% y Rosa de Bengala con un 97,7%.

Además, en la presente investigación se obtuvo una UPA Positiva a FPA en leche, pero negativa a RB y cELISA, esto se debe a la alta sensibilidad del test, así como lo expresa Gall, Nielsen, Bermudez, Moreno, & Smith, (2002), donde nos indica que la prueba de fluorescencia polarizada tiene una sensibilidad y especificidad de 100% y 95,9%, respectivamente, presentando además ventajas al ser una prueba menos invasiva con el animal, de fácil uso y capaz de detectar anticuerpos a niveles más bajos que los del test de inmunoensayo indirecto para leche y el ensayo de fluorescencia polarizada para muestras individuales de leche.

De igual manera se reportó datos de las pruebas como negativo a FPA en leche pero positivo a RB y cELISA en suero sanguíneo, esto debido a que aunque cELISA permite discriminar animales vacunados con S19 de aquellos infectados naturalmente, estos resultados positivos a RB y cELISA pueden asociarse a estados de vacunación previos al muestreo o a estados de

infección temprana donde cELISA presenta mejores niveles de sensibilidad que FPA, y por ende RB tiene su característica que no discrimina animales vacunados de aquellos infectados naturalmente como lo menciona Rosero, Rosales, Benavides, Cortez, & Cevallos,(2018).

Otro resultado obtenido fue negativo a FPA en leche, pero positivo a RB y negativo a cELISA esto se debe a que el Test de rosa de bengala no discrimina anticuerpos vacunales es decir detecta en los sueros sanguíneos restos de vacunas como la cepa 19 tal como lo demuestra en su investigación (Tuquerres, 2013). donde manifiesta que esto se debe a la reacción de la inmunoglobulina M ya que por lo general la IgG2 desaparece rápidamente y la IgG1 es inactiva a los pocos días de vacunación.

También como resultado se obtuvo un total de 51 UPAs negativas a los tres test esto se debe principalmente a que la enfermedad de brucelosis bovina no está presente en los animales y al principio de activo de las pruebas debido a su sensibilidad y especificidad, aunque FPA es realizada en leche y se fundamenta en la actividad de polarización del anticuerpo unido a un marcador y rosa de bengala se basa en la aglutinación y cELISA se basa en la unión primaria de ensayos. Tal y como lo afirma (Praud *et al.*, 2016). Además, existe una alta relación entre las pruebas debido a que tienen similares valores de sensibilidad y especificidad, como lo indica Praud, (2016). donde evaluó la sensibilidad y especificidad de estas pruebas en 5111 muestras de Unidades Productoras Agropecuarias, mostrando una sensibilidad para FPA de un 99%, en tanto que cELISA fue de 98% y Rosa de Bengala con un 97,7%, en cuanto a especificidad la prueba de fijación del complemento con 99,88%, aglutinación del suero 99,88% y Rosa de Bengala 99,89%. Pudiendo identificar animales positivos dentro de la UPAs con un intervalo de confianza de 95%.

Además, se puede observar una concordancia buena entre la Prueba de FPA en leche y RB en suero sanguíneo con un índice Kappa de 0.608 así como lo demuestra en su investigación Holguín (2001), el cual trabajo con 6271 animales donde obtuvo valores de concordancia entre las pruebas antes mencionadas de 0,432.

También se puede observar una concordancia muy buena entre FPA en leche y cELISA en suero sanguíneo con valores de índice Kappa de 0.854, en comparación a los resultados de Holguín (2001), que obtuvo un valor de 0.808 con valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas de FPA y RB respecto a cELISA de 100% para FPA y RB con 41,9% y 99,5%

respectivamente. Además, una de las ventajas es que FPA en leche y cELISA en suero discriminan animales vacunados de aquellos naturalmente infectados.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

El diagnóstico de brucelosis bovina se realizó a un total de 99 UPAs, a través de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche, y a un total de 1668 animales a través de la prueba Rosa de Bengala y cELISA.

En la comparación de las pruebas diagnósticas: (1) 26 resultaron positivas a los tres test, (2) una positiva a FPA y negativa a RB y cELISA, (3) dos positivas a RB, cELISA y negativa a FPA, (4) 19 positivas a RB y negativas a FPA y cELISA, y (5) 51 negativas a las tres pruebas.

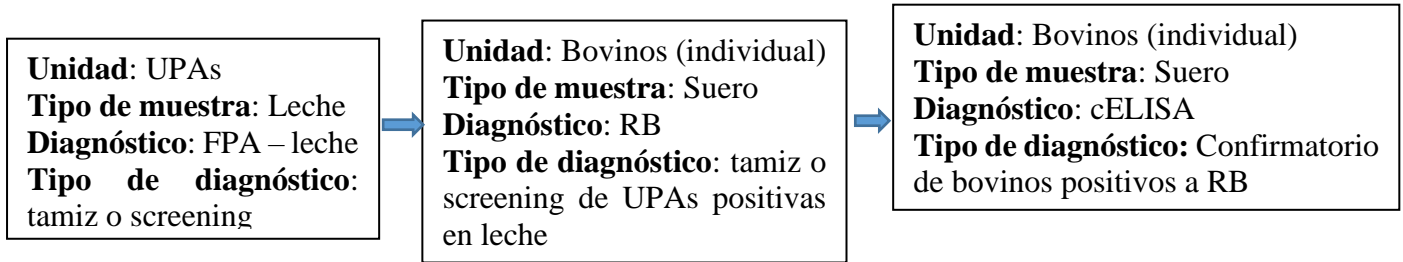
La concordancia entre la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche y Rosa de Bengala tuvo un coeficiente Kappa de 0,608 (0,450 – 0,767 IC 95%), que denota una concordancia buena entre las dos pruebas.

La concordancia entre la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche y cELISA tuvo un coeficiente Kappa de 0,854 (0,740 – 0,967 IC 95%), que denota una concordancia muy buena entre las dos pruebas.

La prevalencia brucelosis bovina a nivel de UPAs mediante la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche es de 27,27 %.

5.2. RECOMENDACIONES

Una vez analizados los datos obtenidos se recomienda utilizar el esquema de diagnóstico para brucelosis bovina que se indica a continuación, en virtud que existe una concordancia muy buena entre la prueba tamiz en leche FPA y la prueba tamiz en suero RB, así como también con la prueba confirmatoria cELISA respectivamente:



Realizar futuras investigaciones de prevalencia e incidencia de la brucelosis bovina utilizando el esquema de muestreo y diagnóstico indicado anteriormente.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramonte, J. S. (13 de Diciembre de 2019). *REPOSITORIO UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO*. Obtenido de REPOSITORIO UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO : <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/8315/BC-4715%20SALAZAR%20ABRAMONTE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Acha, P., & Szyfres, B. (2001). *Brucellosis. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. Washington,; Pan American Health Organization,.
- Acosta, M., & Ortiz, & M. (2010). Prueba del Anillo en Leche para la Vigilancia Epidemiológica de Brucelosis Bovina, Lima, Perú. *Revista Argentina Veterinaria*, 1- 4. Obtenido de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/prueba-del-anillo-en-leche-para-la-vigilancia-epidemiologica-de-brucelosis-bovina.pdf>
- AGROCALIDAD. (18 de Junio de 2008). *registro oficial - Agrocalidad*. Obtenido de registro oficial - Agrocalidad: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/02-control-zoosanitario/Resolución%20025.pdf>
- AGROCALIDAD. (Febrero de 2009). *programa nacional de control de brucelosis Agrocalidad*. Obtenido de programa nacional de control de brucelosis Agrocalidad: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/02-control-zoosanitario/Resoluci%C3%B3n%20025.pdf>
- Andrade, M. A., & Morera, M. O. (2014). *Senasa PRUEBAS DIAGNOSTICAS EN BRUCELOSIS BOVINA*. . Obtenido de Senasa PRUEBAS DIAGNOSTICAS EN BRUCELOSIS BOVINA. : <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/12/Pruebas-diagnosticas-en-Brucelosis-Bovina.pdf>
- Becerra, E. A., & Olivo, L. J. (09 de DICIEMBRE de 2013). *Repositorio Digital UPEC*. Obtenido de Repositorio Digital UPEC: <http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/35/1/171%20INCIDENCIA%20DE%20BRUCELOSIS%20BOVINA%20%28BRUCELLA%20ABORTUS%29%20EN%20LOS%20HATOS%20LECHEROS%20DE%20LA%20ASOCIACION%20DE%20RANCHEROS%20DEL%20NORTE%20DE%20PARROQUIA%20EL%20CARMENO%20-%20AYALA%20>

- Castro, J. M. (2015). *Repositorio Universidad Estatal de Quevedo*. Obtenido de Repositorio Universidad Estatal de Quevedo: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1504/1/T-UTEQ-0167.pdf>
- Cevallos Falques, O. F., & Meza Pauta, J. A. (2020). *Repositorio UTEQ "Prevalencia de brucelosis bovina con la prueba de rosa de bengala en el Cantón El Empalme"*. Obtenido de Repositorio UTEQ "Prevalencia de brucelosis bovina con la prueba de rosa de bengala en el Cantón El Empalme".: <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/5319>
- Cevallos, Y. L. (2018). *UPEC Repositorio Digital*. Obtenido de UPEC Repositorio Digital: <http://repositorio.upec.edu.ec:8080/bitstream/123456789/610/1/FUERTES%20CEVALLOS%20YADIRA%20LICETH-%20TESIS-Empastar-%20Final....pdf>
- CFSPH. (MAYO de 2018). *Brucellosis*. Obtenido de Brucellosis: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>
- Changoluisa, M. D., & Noroña, G. E. (Junio de 2011). *Determinación de brucelosis bovina (brucella abortus) con la prueba de campo rosa de bengala en la asociación "Union Libre" de la parroquia 10 de Agosto provincia de Pastaza*. Obtenido de Determinación de brucelosis bovina (brucella abortus) con la prueba de campo rosa de bengala en la asociación "Union Libre" de la parroquia 10 de Agosto provincia de Pastaza.: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/842/1/T-UTC-1193.pdf>
- Chavisnan, P. H. (10 de Mayo de 2018). *Repositorio Digital UPEC*. Obtenido de Repositorio Digital UPEC: <http://repositorio.upec.edu.ec:8080/bitstream/123456789/603/1/INFORME%20DE%20INVESTIGACION%20POLIVIO%20GONZALEZ.pdf>
- Cordova, C. S. (28 de Marzo de 2019). *REPOSITORIO UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL SUR*. Obtenido de REPOSITORIO UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL SUR: <https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/823/TL-Samame%20C.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cortez, D. N. (10 de Mayo de 2018). *Repositorio Upec*. Obtenido de Repositorio Upec: <http://190.15.129.74/bitstream/123456789/604/1/TESIS%20DAGMAR%20JATIVA.pdf>
- Estein, S. M. (2006). Brucelosis: Inmunidad y vacunación. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 4-7.
- Fernández, P., Pértegas, D., & Valdés, C. (20 de 04 de 2004). *fisterra*. Obtenido de fisterra: https://www.fisterra.com/mbe/investiga/medidas_frecuencia/med_frec2.pdf

- Gall, D., Nielsen, K., Bermudez, M. R., Moreno, F., & Smith, P. (2002). Fluorescence Polarization Assay for Detection of *Brucella abortus* Antibodies in Bulk Tank Bovine Milk Samples. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, Vol. 9, No. 6, 1356–1360.
- Guamán, S. M. (2017). *Repositorio Universidad de Cuenca*. Obtenido de Repositorio Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26388/4/Tesis.pdf.pdf>
- Holguin, C. A. (18 de Enero de 2001). *Cybertesis UACH*. Obtenido de Cybertesis UACH: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fvp657d/doc/fvp657d.pdf>
- Julio, J. A. (12 de Diciembre de 2019). *REPOSITORIO PUCESI*. Obtenido de REPOSITORIO PUCESI: http://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/532/1/1_%e2%80%9cPrevalencia%20y%20factores%20de%20riesgo%20de%20la%20brucelosis%20bovina%20en%20ganader%c3%adas%20de%20Imbabura%20que%20proveen.pdf
- Maldonado, J., Kowalski, A., Milla, M., & Villasmil, M. R. (2010). Implementación de la prueba del anillo en leche y elisa indirecto para el diagnóstico de brucelosis en rebaños doble propósito del estado Lara, Venezuela. *Scielo*, 1. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300004
- Marco, R. P., & Carlos, J. M. (Enero de 2021). *Repositorio Universidad Técnica de Ambato: Comparación de dos pruebas diagnósticas brucella ab test kit- elisa competitivo de alta sensibilidad para brucelosis bovina en un hato lechero del cantón Cayambe provincia de Pichincha*. Obtenido de Repositorio Universidad Técnica de Ambato: Comparación de dos pruebas diagnósticas brucella ab test kit- elisa competitivo de alta sensibilidad para brucelosis bovina en un hato lechero del cantón Cayambe provincia de Pichincha: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/32030>
- Martínez, L. (06 de Junio de 2017). *Prueba de kappa Gaby - SlideShare*. Obtenido de Prueba de kappa Gaby - SlideShare: <https://es.slideshare.net/gabypapime/prueba-de-kappa-gaby>
- Memish, Z. A., & Balkhy, H. H. (2004). Brucellosis and International Travel. *Journal of Travel Medicine* 11:, 49–55.
- Montes, I. (2019). *Diagnostico de la brucelosis*. Obtenido de Diagnostico de la brucelosis : <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/diagbruce.pdf>

- Morales Cumba, E. L., & Morillo Carrera, D. A. (2020). *REPOSITORIO UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR*. Obtenido de REPOSITORIO UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/23622/1/UCE-FMVZ-MORALES%20ESTEFANIA-MORILLO%20DANIEL.pdf>
- Muñoz, J. C. (08 de Septiembre de 2020). *Repositorio Universidad Tecnica de Ambato*. Obtenido de Repositorio Universidad Tecnica de Ambato: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32030/1/Tesis%20175%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20681%20Juan%20Carlos%20Jurado.pdf>
- Nielsen, K., & Gall, D. (2001). FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAY FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELOSIS: A review *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* 22:, 183-201.
- Nielsen, K., Smith, P., Gall, D., Perez, B., Cosma, C., Mueller, P., . . . & Bosse, J. (1996). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Veterinary microbiology* 52, 165 - 173.
- Obregón, O. G. (2020). *Repositorio Universidad de La Salle*. Obtenido de Repositorio Universidad de La Salle: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1013&context=maest_agrociencias
- OIE. (Enero de 2004). *ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL*. Obtenido de ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL: <https://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
- OIE. (2016). *Informe final*. PARIS: SG/IF.
- OIE. (2021). *ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SANIDAD ANIMAL BRUCELOSIS*. Obtenido de ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SANIDAD ANIMAL BRUCELOSIS: <https://www.oie.int/es/enfermedad/brucelosis/>
- Paola, G. O. (08 de Marzo de 2018). *Repositorio Universidad Catolica Santiago de Guayaquil*. Obtenido de Repositorio Universidad Catolica Santiago de Guayaquil: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/10380>
- Praud A, D.-F. M., D, F., M, J., M, O., A, S., M, T., & B., T. D.-B. (04 de Julio de 2016). Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarisation assay for the diagnosis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal, Volume 216*, 38 - 44. Obtenido de PUBMED.GOV: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.014>

- Proaño, J. (Septiembre de 2015). *EL NORTE*. Obtenido de EL NORTE: <https://www.elnorte.ec/carchi/carchi-muestra-potencial-ganadero-LREN58739>
- Productor, E. (06 de Abril de 2016). *Ecuador: La producción ganadera se consolida gracias al mejoramiento genético*.
- Rivera, D., Rueda, O., Calderon, C., Marino, O., & Gall, D. &. (2003). Comparative evaluation of the indirect enzyme-linked immunosorbant assay in milk for the detection of cattle infected with *Brucella abortus*, in herds located in the province of Cundinamarca, Colombia. *Revue Scientifique et Technique-Office International des*, 1065-75.
- Ron, J. (2003). Validación de Técnicas Diagnósticas para la Detección de Brucelosis y Estudio Epidemiológico en. *Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Tropical Animal*, 118.
- Rosero, E. I., Rosales, Benavides, H., Cortez, D. J., & Cevallos, P. G. (2018). *Tropicultura*. Obtenido de Tropicultura: <https://popups.uliege.be/2295-8010/index.php?id=460&file=1>
- Rosero, E. M. (2013). Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador. *Revista Sathiri Sembrador*. Obtenido de <https://revistasdigitales.upec.edu.ec/index.php/sathiri/article/view/253/299>
- Salas, T. V. (23 de Julio de 2008). *T-ESPE-IASA I-003803.pdf - El repositorio ESPE*. Obtenido de T-ESPE-IASA I-003803.pdf - El repositorio ESPE: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2507/1/T-ESPE-IASA%20I-003803.pdf>
- Santos, S. (22 de Febrero de 2016). *Contextoganadero*. Obtenido de Contextoganadero: <https://www.contextoganadero.com/cronica/detras-del-telon-de-las-pruebas-de-brucelosis-bovina>
- SENASA. (2020). *BRUSELOSIS-Y-LEPTOSPIRA-SE-24_2020.pdf*. Obtenido de BRUSELOSIS-Y-LEPTOSPIRA-SE-24_2020.pdf: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/06/BRUSELOSIS-Y-LEPTOSPIRA-SE-24_2020.pdf
- Tuquerres, M. M. (Abril de 2013). *REPOSITORIO UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA*. Obtenido de REPOSITORIO UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4765/6/UPS-YT00155.pdf>

Anexo 2: Certificado del abstract por parte de idiomas



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
FOREIGN AND NATIVE LANGUAGE CENTER

ABSTRACT- EVALUATION SHEET				
NAME: Carlos Fabricio Naranjo García DATE: 27 de septiembre de 2021 TOPIC: "Evaluación de la prueba de Fluorescencia Polarizada en leche para el diagnóstico de brucelosis bovina." MARKS AWARDED QUANTITATIVE AND QUALITATIVE				
VOCABULARY AND WORD USE	Use new learnt vocabulary and precise words related to the topic	Use a little new vocabulary and some appropriate words related to the topic	Use basic and simplistic words related to the topic	Limited vocabulary and inadequate words related to the topic
	EXCELLENT: 2	GOOD: 1,5	AVERAGE: 1	LIMITED: 0,5
WRITING COHESION	Clear and logical progression of ideas and supporting paragraphs.	Adequate progression of ideas and supporting paragraphs.	Some progression of ideas and supporting paragraphs.	Inadequate ideas and supporting paragraphs.
	EXCELLENT: 2	GOOD: 1,5	AVERAGE: 1	LIMITED: 0,5
ARGUMENT	The message has been communicated very well and identify the type of text	The message has been communicated appropriately and identify the type of text	Some of the message has been communicated and the type of text is little confusing	The message hasn't been communicated and the type of text is inadequate
	EXCELLENT: 2	GOOD: 1,5	AVERAGE: 1	LIMITED: 0,5
CREATIVITY	Outstanding flow of ideas and events	Good flow of ideas and events	Average flow of ideas and events	Poor flow of ideas and events
	EXCELLENT: 2	GOOD: 1,5	AVERAGE: 1	LIMITED: 0,5
SCIENTIFIC SUSTAINABILITY	Reasonable, specific and supportable opinion or thesis statement	Minor errors when supporting the thesis statement	Some errors when supporting the thesis statement	Lots of errors when supporting the thesis statement
	EXCELLENT: 2	GOOD: 1,5	AVERAGE: 1	LIMITED: 0,5
TOTAL AVERAGE	TOTAL 9			
	9 - 10: EXCELLENT 7 - 8,9: GOOD 5 - 6,9: AVERAGE 0 - 4,9: LIMITED			



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL
CARCHI FOREIGN AND NATIVE LANGUAGE
CENTER**

Informe sobre el Abstract de Artículo Científico o Investigación.

Autor: Carlos Fabricio Naranjo García

Fecha de recepción del abstract: 27 de septiembre de 2021

Fecha de entrega del informe: 27 de septiembre de 2021

El presente informe validará la traducción del idioma español al inglés si alcanza un porcentaje de: 9 – 10 Excelente.

Si la traducción no está dentro de los parámetros de 9 – 10, el autor deberá realizar las observaciones presentadas en el ABSTRACT, para su posterior presentación y aprobación.

Observaciones:

Después de realizar la revisión del presente abstract, éste presenta una apropiada traducción sobre el tema planteado en el idioma Inglés. Según los rubros de evaluación de la traducción en Inglés, ésta alcanza un valor de 9, por lo cual se valida dicho trabajo.

Atentamente



Ing. Edison Peñafiel Arcos MSc
Coordinador del CIDEN

Anexo 3: Figuras test FPA, Rosa de Bengala y cELISA.

Prueba de Fluorescencia polarizada en Leche (FPA)



Figura 10: Muestras de leche.



Figura 9: Equipo de lectura con luz polarizada.

Realización Test de Rosa de Bengala



Figura 12 : Lectura de Test.



Figura 11: Realización Test.

Interpretación de Resultados



Resultado positivo (+)



Resultado negativo (-)

Figura 13: Interpretación de Resultados.

Realización Test de Elisa Competitiva (cELISA)

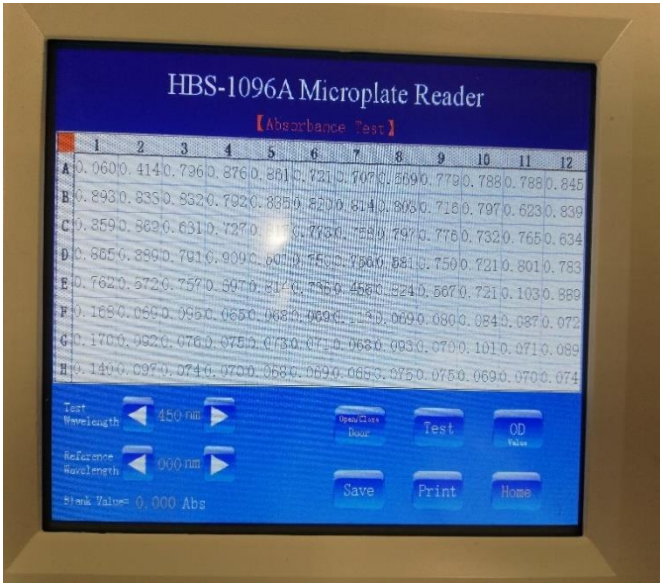


Figura 15: Equipo de Lectura cELISA.

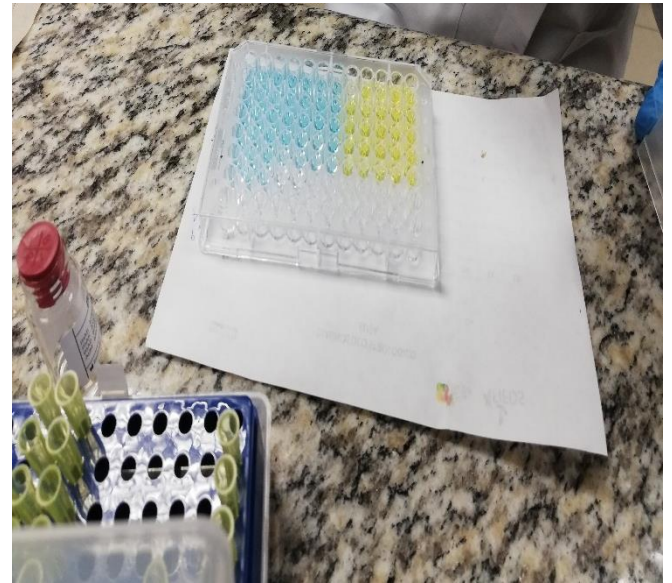


Figura 14: Realización Test de cELISA.