

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO

Tema: “Validación de dos pruebas serológicas tamiz para el diagnóstico de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en animales vacunados con cepa 19 en la provincia del Carchi”

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

AUTORA: Dagmar Nataly Játiva Cortez.

TUTOR: Ing. Marcelo Ibarra M.Sc.

TULCÁN - ECUADOR

2018

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR

Certificamos que la estudiante Dagmar Nataly Játiva Cortez con el número de cédula 0401742325 ha elaborado el trabajo de titulación: “Validación de dos pruebas serológicas tamiz para el diagnóstico de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en animales vacunados con cepa 19 en la provincia del Carchi”

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.....

Ing. Marcelo Ibarra M.Sc.

f.....

DMVZ. Luis Balarezo M.Sc.

Tulcán, 10 de mayo del 2018

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente trabajo de titulación constituye requisito previo para la obtención del título de Ingeniera de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales.

Yo, Dagmar Nataly Játiva Cortez con cédula de identidad número 0401742325 declaro: que la investigación es absolutamente original, autentica, personal. Los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

f.....

Dagmar Nataly Játiva Cortez

Tulcán, 10 de mayo del 2018

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Dagmar Nataly Játiva Cortez declaro ser autora de los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “Validación de dos pruebas serológicas tamiz para el diagnóstico de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en animales vacunados con cepa 19 en la provincia del Carchi” y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

f.....

Dagmar Nataly Játiva Cortez

Tulcán, 10 de mayo del 2018

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis me gustaría agradecer a Dios por permitirme alcanzar mi meta más ansiada.

A la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI por permitirme estudiar y formarme profesionalmente durante todo este proceso de aprendizaje.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Ing. Marcelo Ibarra M. Sc. por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad, su paciencia, su experiencia, y su motivación lo que ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

Quiero extender un sincero agradecimiento al Ing. Hernán Benavidez M. Sc. su colaboración fue de gran ayuda durante mis estancias en su hato ganadero. Le agradezco también por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante el desarrollo de este trabajo.

A mi lector de investigación DMVZ. Luis Balarezo M. Sc. por su apoyo y seguimiento en el transcurso del desarrollo de esta investigación.

De manera especial quiero agradecer a mis amigos y compañeros de investigación Yadira Fuertes y Polivio González, porque sin el equipo que formamos, no habiéramos logrado esta meta.

De manera especial quiero agradecer a la familia Cortez Rosero por extenderme la mano cuando lo necesité y brindarme el mejor ejemplo de lo que significa una familia unida y trabajadora.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa. A mis padres, Glenda y Libardo, por su ejemplo de lucha y honestidad; a mi hermano Jhon Humberto por ser un ejemplo de valentía, capacidad y superación...por ellos y para ellos.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi amada madre la Sra. Glenda Cortez, por ser la persona a quien más amo en el mundo, por ser la mejor mamá, la mejor amiga, por demostrarme que el amor debe iniciar por uno mismo, por entregar su vida con amor y ahínco a mi hermano y a mí, por ser el ser por quien daría la vida, por amarme tal y como soy.

A mi padre el Ing. Libardo Játiva, por ser un ejemplo de trabajo, honestidad y perseverancia, quien me enseñó que luchar por un sueño, es la mejor inversión en la vida, y que se debe trabajar hasta lograrlo y nunca parar por cansancio.

A mi hermano Jhon Humberto por ser el hombre que me enseñó a tomar retos a romper las riendas y forjar un futuro por mis propias decisiones, por ser el mejor hermano que Dios me dio.

A mis abuelitos la Sra. Zoila Mejía, Sra. Laura Vizcaíno y Sr. Humberto Játiva por demostrarme su amor, por ser mis segundos padres y por darme lindas experiencias en vacaciones y principalmente por enseñarme a amar el campo.

Al Ing. Jairo Chulde por ser un gran amigo y guía, quien en incontables ocasiones supo aconsejarme y robarme más de una sonrisa.

ABREVIATURAS

Unidades de medida:

μl	Microlitro.
μg	Microgramo.
mm	Milímetros.
°C	Grados centígrados.
pH	Potencial hidrógeno.
M	Mol
ABC	Área bajo la curva

Términos inmunológicos:

Ac	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
LPS	lipopolisacárido.

Otras abreviaciones:

UPAs	Unidades de Producción Agrícola.
S19	Vacuna cepa 19.
RB51	Vacuna RB 51.
ROC	Curva operativa del receptor.
S	Sospechoso
PI	Índice de Rendimiento

Pruebas diagnósticas:

RB	Rosa de Bengala.
iELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto, en suero sanguíneo.
“SAT”	Sero-aglutinación lenta en tubo.
“SAT-2Me”	Prueba Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol.
“EDTA”	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate.
“CFT”	Prueba de Fijación de Complemento,"Complement Fixation Test".
“ST”	Prueba cutánea, "Skin test".
“FPA”	fluorescencia polarizada.
“BPA”	Antígeno Buferado en Placa,"Buffered Plate Agglutination Test".

Instituciones:

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería.
MSP	Ministerio de Salud Pública.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal.
SESA	Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria.
CFSPH	The Center for Food Security and Public Health.
MSPN	Ministerio de Salud Presidencia de la Nación.
PEBB	Programa Oficial de Erradicación de Brucelosis Bovina.
AGROCALIDAD	Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro Agrocalidad.

ÍNDICE

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR.....	ii
AUTORÍA DE TRABAJO	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xii
I. PROBLEMA.....	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	5
1.3. JUSTIFICACIÓN	5
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	7
1.4.1. Objetivo General	7
1.4.2. Objetivos Específicos	7
1.4.3. Preguntas de Investigación	8
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	9
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	9
2.2. MARCO TEÓRICO	11
2.2.1. Síntomas	11
2.2.2. Etiología	11
2.2.3. Patogenia	12
2.2.4. Estructura.....	13
2.2.5. Respuesta Inmunológica.....	14
2.2.6. Diagnóstico.....	15
2.2.6.1. Prueba Rosa de Bengala (RB)	15
2.2.7. Reacciones cruzadas	16
2.2.8. Prevención	17
2.2.9. Control.....	17

III. METODOLOGÍA	19
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO.....	19
3.1.1. Enfoque	19
3.1.2. Tipo de Investigación.....	19
3.2. HIPÓTESIS	19
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	20
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS	21
3.4.1. Procedimental	21
3.4.2. Laboratorio	21
3.4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. RESULTADOS	25
4.1.1. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas RB, “SAT” y “SAT-2Me”	25
4.1.2. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200.....	26
4.1.3. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT-2Me” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200	26
4.1.4. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica RB para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.	27
4.1.5. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT” para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.	27
4.1.6. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT- 2Me para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.	28
4.1.7. Comparación de las curvas ROC para RB, “SAT” y “SAT-2Me”. Se muestra área bajo la curva de las gráficas generadas para cada prueba.....	28
4.2. DISCUSIÓN	29
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
5.1. CONCLUSIONES	33
5.2. RECOMENDACIONES	33
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	I
VII. ANEXOS.....	V

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Definición y Operacionalización De Variables	20
Tabla 2. Sensibilidad y especificidad.	24
Tabla 3. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas RB, “SAT” y “SAT-2Me” en animales vacunados con S19.	25
Tabla 4. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200, en animales vacunados con S19.	26
Tabla 5. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT-2Me” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 en animales vacunados con S19.	27
Tabla 6. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica RB para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.	27
Tabla 7. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT” para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.	28
Tabla 8. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT-2Me” para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.....	28
Tabla 9. Comparación de las curvas ROC para RB, “SAT” y “SAT-2Me”. Se muestra el área bajo la curva de las gráficas generadas para cada prueba, en animales vacunados con S19.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Comparación de curvas ROC	29
--	----

RESUMEN

Se validó dos pruebas serológicas tamiz Rosa de Bengala (RB) y Aglutinación Lenta en Tubo (“SAT”) y su variante Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 mercaptoetanol (“SAT 2-Me”) para el diagnóstico de Brucelosis bovina (*Brucella abortus*) en animales vacunados con S19 en la provincia del Carchi”, se analizaron 117 sueros bovinos con estatus sanitario y de vacunación conocidos, Los valores de sensibilidad y especificidad estimada de cada prueba 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% (IC95%), seguido de la prueba RB con 74,5% (IC95%), y finalmente la prueba “SAT-2Me” con un 73,1% (IC95%).

Palabras clave: *Brucella abortus*, sensibilidad, especificidad, Curva Operativa del Receptor.

ABSTRACT

To validate two serological screening tests RB, SAT and its variant SAT-2Me for the diagnosis of bovine brucellosis (*Brucella abortus*) in animals vaccinated with S19 in the province of Carchi, 117 bovine serum from cattle with known health and vaccination status were analyzed. The estimated sensitivity and specificity values of each test were: 100% and 59.4% (RB), 100% and 67.6% (SAT), 88.9% and 68.5% (SAT-2Me), respectively. Through the Receiver Operative Curve (ROC) analysis the best test was determined, being SAT with a value of 83,8% (95% CI) was the best, followed by the RB test with 74,5% (95% CI), and finally the SAT-2Me test with 73,1% (95% CI), assuming the area under the curve.

Keywords: *Brucella abortus*, sensitivity, specificity, Receiver Operative Curve.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis, también conocida como “Fiebre de Malta”, o “fiebre ondulante” en los humanos, y como “enfermedad de Bang” o “aborto contagioso”, en los bovinos es una enfermedad altamente contagiosa, causada por bacterias gram negativas del género *Brucella* (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2004).

El género *Brucella* afecta a muchas especies animales en todos los continentes. Los gérmenes pueden sobrevivir en el medio ambiente dentro de material orgánico (heces, abortos, placentas, entre otros) durante mucho tiempo, una característica única en las bacterias no esporuladas (Gil y Sarmiento, 2001).

La brucelosis tiene una grave repercusión económica no solo por la pérdida de crías sino también por la interrupción de la lactancia regular, repeticiones de celo, infertilidad entre otros. Es una enfermedad de distribución mundial, y pocos son los países que han logrado erradicarla. Su distribución es irregular y las tasas de incidencia son muy variables (Contrina y Fernández, 1991).

Desde el punto de vista zoonótico, la brucelosis es importante por sus repercusiones negativas en salud pública especialmente en los trabajadores encargados del manejo de hatos ganaderos y con el faenamiento de ganado, al estar en contacto con animales infectados y para la población que consume productos contaminados (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, 2009).

Para controlar la brucelosis es necesario pruebas diagnósticas, y para el caso de esta enfermedad existen un sin número de ellas, clasificadas en pruebas de aglutinación, precipitación y bacteriológica, como las más importantes, pero una sola de ellas no es determinante para la presencia o no de brucelosis, ya que presentan inconvenientes debido a que pueden encontrarse reacciones cruzadas, falsos positivos y falsos negativos. Esto atribuido a reacciones cruzadas puede presentarse con otras bacterias gram negativas (Blood, 1987) lo que origina resultados falso positivos, como también, puede presentarse debido a la presencia de anticuerpos originados por vacunación con la vacuna S19 y problemas en la muestra. Además, los resultados falso negativos se presentan en etapas crónicas de la infección.

Por tal motivo la presente investigación tiene el objetivo de validar mediante comparación de pruebas serológicas tamiz para el diagnóstico de brucelosis bovina (*B. abortus*) en animales vacunados con S19 en la provincia del Carchi, considerada una provincia netamente ganadera ya que posee 93.784 bovinos (AGROCALIDAD, 2009), además que es una región considerada de alta prevalencia (1,97%-10,62%) para brucelosis según (Ministerio de Agricultura y Ganadería - Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria, 1999).

I. PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La brucelosis ha causado y causa grandes pérdidas económicas a la ganadería del país, además sus características epidemiológicas y evolutivas, hacen que tenga un impacto social y económico muy superior al de otras enfermedades, generando pérdidas económicas en el país, estimadas en 5.000.000 de dólares al año, esto a causa de la disminución en la producción de leche, abortos de vacas y diversos problemas de infertilidad en el ganado infectado (SESA, 2005).

Carchi posee una alta prevalencia (1,97%-10,62%) que, a pesar de los esfuerzos realizados para controlar y erradicar la enfermedad, actualmente la situación epidemiológica es incierta debido al desconocimiento de la enfermedad, condiciones sanitarias deficientes en sistemas de producción animal tradicional, además la inexistencia de sistemas encargados del seguimiento epidemiológico adecuados para el control de la enfermedad (MAG-SESA, 1999).

El diagnóstico de brucelosis cuenta con un número considerable de pruebas serológicas, siendo estas pruebas de aglutinación, prueba de fijación de complemento, prueba de precipitación y ensayos de unión primarios, además muchas de estas se modifican de varias maneras para aumentar sus características (Estein, 2006).

Los ensayos de unión primaria miden directamente la interacción del anticuerpo y el antígeno, mientras que las pruebas serológicas convencionales miden fenómenos secundarios como la aglutinación o activación del complemento respectivamente. Dependiendo de la sensibilidad y especificidad, las pruebas pueden ser utilizadas como tamizaje o confirmatorias de la enfermedad (Gall & Nielsen, 2004).

Las pruebas serológicas, utilizadas en tamizaje, poseen ventajas como por ejemplo: su relativa fácil implementación, alta sensibilidad, su costo aceptable, pero de igual forma poseen inconvenientes, como la existencia de una gran variabilidad de los resultados dependiendo de: (1) si el área de la cual proceden las muestras es considerada una zona

endémica o no, (2) del umbral a partir del cual se considera como positivo un resultado, (3) así como, a la correcta estandarización de reactivos y procedimientos (Ron, 2003).

El problema radica en que muchas de las pruebas diagnósticas para brucelosis producen reacciones falso positivas atribuidas a reacciones cruzadas debido a: vacuna S19 debido a la producción de anticuerpos contra el LPS-O (lipopolisacárido O), inducidos por la vacuna como lo menciona por Vargas, (2002); así como también a reacciones cruzadas con bacterias como *Escherichia hermanni* y *E. coli* O: 157, *Salmonella* O: 30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O: 1, y *Yersinia enterocolitica* O: 9, siendo esta última la más predominante (Corbel, 1997).

La vacuna es altamente eficaz, se aplica una vez en la vida del animal, pero, presenta la desventaja de producir anticuerpos aglutinales que interfieren en las pruebas de aglutinación, así como en el iELISA y el SKIN TEST. Cabe mencionar que la vacuna S19 es patógena para el hombre (Estein, 2006).

Entre las características de las pruebas de la presente investigación se mencionan:

Prueba Rosa de Bengala (RB): (tamiz) detecta anticuerpos IgM e IgG; presenta falsos negativos con casos iniciales o tardíos de la infección, los resultados falso positivos son causados por la presencia de anticuerpos originados por la vacuna S19, reacciones cruzadas con otras bacterias, al igual, que la falta de ejecución de la prueba al reportar como positiva una muestra que ha permanecido en congelación por un periodo considerable de tiempo o que únicamente contiene grasa (Ron, 2003).

Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo (“SAT”): (tamiz) detecta anticuerpos IgM y en menor grado IgG (detecta infección aguda); presenta resultados falso positivos con la presencia de anticuerpos post vacunales, pueden presentarse reacciones cruzadas con otras bacterias, en etapas crónicas de la infección existen resultados falso negativos, se puede observar el fenómeno de prozona (resultados negativos en primeras diluciones y positivos en los siguientes) (Ron, 2003).

Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol (“SAT-2Me”): es una modificación a la prueba “SAT”; se puede observar resultados falsos negativos con

fenómeno de prozona, y resultados falso positivos debido a anticuerpos post vacunales y reacciones cruzadas con otras bacterias (Ron, 2003).

Aunque la examinación bacteriológica, es la única forma de obtener un diagnóstico confiable, no obstante, su alto costo, difícil implementación y alto riesgo de contaminación son un limitante, lo cual, no permite su uso rutinario, quedando restringida únicamente a laboratorios de seguridad "tipo 3" (Bowden, 1996, citado por Ron, 2003). Por ello muchas de las investigaciones sobre prevalencia de la enfermedad en el país, no debe ser considerada como real debido al problema de especificidad de las pruebas diagnósticas y a la falta de información sobre el estatus de vacunación en Ecuador (Ibarra, 2013).

Ron (2003) menciona que la situación epidemiológica de la brucelosis no ha cambiado debido al desconocimiento de la enfermedad en nuestro país. Gil, A.; y Samartino, L. (2001) menciona que Ecuador carece de información sobre la situación de la brucelosis en el país. Además, Angulo (2006) menciona que la falta de investigación sobre la verdadera prevalencia de la enfermedad dificulta el establecimiento de un programa de control y subestima el verdadero riesgo de la enfermedad para los animales sensibles.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe una comparación entre las pruebas serológicas tamiz Rosa de Bengala (RB), Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo ("SAT") y su variante Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol ("SAT-2Me") en animales vacunados con S19 en la provincia del Carchi?

1.3. JUSTIFICACIÓN

La brucelosis al ser una enfermedad bacteriana contagiosa, es considerada una de las principales enfermedades zoonóticas a nivel mundial, en el hombre se presenta como una enfermedad debilitante con síntomas diversos (AGROCALIDAD, 2009).

La brucelosis bovina en Ecuador está ampliamente extendida y la frecuencia depende de los diferentes sistemas de producción y el manejo que dé al hato ganadero; las pérdidas económicas seguirán siendo importantes en producción, y reproducción las mismas que se ven reflejadas en abortos, disminución de la producción, nacimiento de crías débiles,

esterilidad de animales adultos, metritis, asistencia veterinaria, incremento del periodo interparto y el reemplazo de los animales infectados, incrementando los costos de producción. Además, el ganado infectado tiene libre circulación en el área diseminando la enfermedad (Ron, 2003).

Carchi posee el 8,22% de Unidades de Producción Agropecuarias (UPAs) del Ecuador, 8,74% del total de ganado lechero de la Sierra, y 5% de la producción de leche del Ecuador (Gobierno Provincial del Carchi, 2013).

A pesar de la existencia del Programa Nacional de Control de Brucelosis bovina el cual se enfoca en disminuir progresivamente los bovinos infectados del país; la situación epidemiológica de la brucelosis no ha cambiado debido al uso indiscriminado de la vacunación con S19 y RB51, el plan tiene como objetivo la identificación de los animales reactivos positivos; eliminación obligatoria en matanza sanitaria; control sanitario de ingreso y egreso de animales (AGROCALIDAD, 2009).

Castro, González, y Prat (2005) es importante mencionar que la bacteria *Brucella abortus* posee una gran capacidad para sobrevivir y permanecer en el ambiente, en el cual las condiciones sean apropiadas. A bajas temperaturas y humedades la bacteria puede sobrevivir en ambientes diversos por largos períodos, es por ello que es necesario determinar la eficiencia de las diferentes pruebas de diagnóstico en este contexto.

Una de las opciones más frecuentes utilizadas para el control de la brucelosis bovina, es la inmunización de los bovinos con la vacuna S19. Lamentablemente la sola estrategia de vacunación no podría erradicar el problema, es necesario la identificación de los animales reactivos positivos y su correcto sacrificio (Ron, 2003).

La S19 de *Brucella abortus* es una cepa lisa que posee la cadena O-LPS, por ello, en animales vacunados con esta cepa se pueden observar anticuerpos post-vacunales específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2 e IgM (Vemulapalli, R, *et al.* 2000). El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un mecanismo de virulencia esencial. Su efectividad en bovinos se basa en

función de la edad de vacunación, dosis, ruta de administración y de la prevalencia de la brucelosis en el hato vacunado (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002).

Los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa interfieren con el diagnóstico tradicional de bovinos infectados con cepas silvestres de *B. abortus*, por lo que tiene un uso limitado en la vacunación del ganado; esta cepa puede también inducir aborto en hembras preñadas y es patógena para la especie humana (World Health Organization, 1997).

Las pruebas diagnósticas RB y “SAT”, “SAT-2Me” presentan ciertas ventajas:

RB requerimiento de laboratorio básico, procedimiento fácil rápido, costo bajo, riesgo de contaminación medio.

“SAT” y “SAT-2Me”: requerimiento de laboratorio medio, presenta dificultad media, costo medio, riesgo de contaminación medio (Ron, 2003).

Por lo anteriormente mencionado se justifica realizar esta investigación ya que la provincia del Carchi es una provincia endémica y con alta prevalencia para brucelosis bovina (*B. abortus*) que además de ser un problema para la producción agropecuaria es un problema de salud pública.

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Validar mediante comparación de sensibilidad y especificidad dos pruebas serológicas tamiz (RB, “SAT”) y su variante (“SAT-2Me”) para el diagnóstico de brucelosis bovina (*B. abortus*) en animales vacunados con S19 en la provincia del Carchi.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad de las pruebas serológicas para diferenciar anticuerpos post-vacunales.
- Estimar los parámetros de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas.

- Definir cuál de las dos pruebas diagnósticas y su variante presenta mejores características para el tamizaje de brucelosis bovina (*B. abortus*) en la provincia del Carchi mediante el análisis ROC.

1.4.3. Preguntas de Investigación

¿Las pruebas RB, “SAT” y “SAT-2Me” permiten diferenciar anticuerpos post-vacunales?

¿Cuáles son los valores estimados de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas RB, “SAT” y “SAT-2Me”?

¿Cuál de las dos pruebas diagnósticas y la variante presenta mejores características para el tamizaje de brucelosis (*B. abortus*) en la provincia del Carchi en animales vacunados con S19?

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Ron (2003) “Validación de técnicas diagnósticas para la detección de brucelosis y estudio epidemiológico en una región andina del Ecuador” en el cual utilizó las pruebas Rosa de Bengala (RB), Aglutinación Lenta en Tubo (“SAT”) en presencia de EDTA, Fijación de Complemento (“CFT”), y un "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto (iELISA). Adicionalmente una prueba cutánea para brucelosis (“ST”), utilizando un alérgeno purificado (Brucellergen, Synbiotics) fue aplicado en los animales, utilizando el método bayesiano, Tomando en consideración la especificidad del “ST” como 100%, la prevalencia de la brucelosis en los animales fue estimada entre 16% y 45%. La sensibilidad y especificidad de cada test fue estimada respectivamente en: 74% y 100% (“ST”), 61% y 86% (iELISA), 59% y 82% (“SAT-EDTA”), 48% y 91% (RB).

Gall & Nielsen (2004) “Diagnóstico serológico de la brucelosis bovina: una revisión del rendimiento de las pruebas y la comparación de costos” mencionan que revisaron más de 50 publicaciones en las que se habían examinado los valores de sensibilidad y especificidad de los ensayos utilizados para la detección de la exposición a *B. abortus*, la suma de los valores de sensibilidad y especificidad para cada prueba se promedió para dar un índice de rendimiento (PI) y permitir una comparación entre las diferentes metodologías. Un puntaje de 200 fue perfecto. Basado en el PI, la prueba de Aglutinación en Placa Antigénica Tamponada (BPAT) clasificó como la más alta (PI = 193,1) entre las pruebas convencionales. Esto indica una mejor precisión que las otras pruebas convencionales, incluyendo la prueba de Rosa Bengala (PI = 167,6) y la prueba de Fijación del Complemento (PI = 172,5), los ensayos de unión primaria, incluyendo el ensayo de Fluorescencia Polarizada (PI = 196,4).

Muñoz, *et.al.* (2005) “Eficacia de varias pruebas serológicas y antígenos para el diagnóstico de la brucelosis bovina en presencia de resultados serológicos falso positivos debido a la bacteria *Yersinia enterocolítica*” menciona que la bacteria *Yersinia enterocolítica* O: 9 “lleva un lipopolisacárido liso (S-LPS) de *Brucella sp.* O-cadena A, C / Y, y es una causa de reacciones serológicas falsas positivas (FPSR) en pruebas estándar

para la brucelosis bovina. Brucella S-LPS, S-LPS de reacción cruzada que representan varias combinaciones de epítomos de cadena O. Se probaron en ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y en precipitación los epítomos de núcleo lipídico A (LPS bruto), polisacárido derivado de S-LPS de *B. abortus*, polisacárido de hapteno nativo, complejos de proteína de membrana externa de grupo LPS rugoso 3, BP26 recombinante y proteínas citosólicas las mismas que son pruebas para detectar brucelosis bovina (sensibilidad) y para diferenciarlo de FPSR (especificidad); ninguna prueba serológica ni combinación de antígenos mostraron sensibilidad y especificidad al 100% simultáneamente.

Corbel (2006) “Brucelosis en humanos y animales” manifiesta que la brucelosis es una enfermedad subaguda o crónica que puede afectar a muchas especies de animales. En los bovinos, ovinos, caprinos, otros rumiantes y cerdos, la fase inicial que sigue a la infección no suele ser evidente.

Angulo (2006) “Encuesta de brucelosis bovina en Ecuador: rendimiento de cinco pruebas diagnósticas” utilizando skin Test; Rosa de Bengala; Fijación del complemento; IELISA; “SAT-EDTA”; utilizando Enfoque bayesiano; obteniendo que el porcentaje de animales positivos varió de 1,19% (RB e iELISA) a 10% (“ST”) en ambos cantones. El enfoque bayesiano encontró prevalencias de 10,88% (7,56-14,94) en El Carmen y 12,07% (9,01-16,02) en Santo Domingo. El mismo enfoque encontró sensibilidades que pasaron del 13% (RB) al 84,32% (“ST”) y especificidades del 96,21% (“SAT-EDTA”) al 99,92% (“ST”) en ambos cantones.

Ibarra (2013) “Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el norte de Ecuador” manifiesta que la sensibilidad del miELISA (99,25%) fue más alta que la PAL (46,11%), pero la especificidad para ambas pruebas (98,5% y 94,92% respectivamente) no presentó diferencias estadísticas. La seroprevalencia de brucelosis en leche (40,24) no puede ser considerada real por la falta de información sobre la vacunación. El miELISA muestra ser la prueba en leche más eficiente para diagnosticar brucelosis en el Ecuador, donde el estado de vacunación es desconocido.

2.2. MARCO TEÓRICO

La brucelosis bovina es una enfermedad altamente contagiosa causada por la bacteria *Brucella abortus*, causa abortos en el ganado bovino, con pérdidas económicas cuantiosas, *B. abortus* incluso afecta a otras especies, como el bisonte, el búfalo entre otras, además es considerada una enfermedad de importancia en salud pública (The Center for Food Security & Public Health., Intitute for International Cooperation in Animal Biologics, 2009).

2.2.1. Síntomas

En el ganado bovino, *B. abortus* causa abortos y mortinatos; los abortos se suelen producir durante la segunda mitad de la gestación y pueden extenderse hasta el último tercio de gestación. Algunos terneros nacen débiles y pueden morir poco tiempo después de nacer, pueden exudar la bacteria. Se puede producir retención de placenta y metritis secundaria (TCFS&PH. & IICAB, 2009).

Además, puede disminuir el período de lactancia ocasionando pérdidas económicas considerables. Después del primer aborto, las preñeces posteriores suelen ser normales naciendo animales débiles; aun así, las vacas pueden excretar el microorganismo en la leche y en las descargas uterinas (secreciones). Puede observarse vesiculitis seminal, epididimitis, orquitis o abscesos testiculares en los toros. La infertilidad sucede en ambos sexos a causa de la metritis o a la orquitis/epididimitis. En algunos países tropicales, los higromas (tumor que a menudo se presenta en la zona de la cabeza y el cuello) constituyen un síntoma frecuente. Se puede producir artritis en algunas infecciones prolongadas. Los síntomas sistémicos no suelen aparecer en infecciones sin complicaciones, las muertes son poco comunes, excepto en el feto o el neonato. Normalmente, la enfermedad no presenta síntomas en hembras no gestantes (TCFS&PH, & IICAB, 2009).

2.2.2. Etiología

Los brucelos son pequeños patógenos intracelulares de aproximadamente 0,5-0,7 μm por 0,6-1,5 μm , cocobacilos aerobios gramnegativos no encapsulados, no móviles, no

formadores de esporas; miembros de la clase α -Proteobacteria (Alton, Jones, Angus , & Verger, 1988).

Seis especies son reconocidas dentro del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. ovis*, y *B. neotomae*. Esta clasificación se basa principalmente en la diferencia en la patogenicidad y en la preferencia del huésped (Corbel , M., & Brinley-Morgan, W. (1984.)). Las principales especies patógenas en el mundo son *B. abortus*, responsable de la brucelosis bovina; *B. melitensis*, el principal agente etiológico de la brucelosis en cabras, camellos y ovejas. *B. suis* ataca principalmente a cerdos, *B. canis* afecta a perro. *B. ovis* afecta principalmente a las ovejas. *B. neotomae* afecta a roedores y *B. maris* que afectan a ballenas, minke, delfines, marsopas y focas (Suárez, 2001).

2.2.3. Patogenia

La *Brucella* spp. tienen por lo menos dos etapas en la infección de los animales, la etapa de infección inicial donde su número aumenta, y la etapa latente, donde se asegura su supervivencia (Halling & Boyle, 2002).

La mayoría de los animales se infectan directamente a través de la mucosa oronasal, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo de los establos con microorganismos que los animales han secretado con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Rivers, Andrews, González-Smith, Donoso, y Oñate, 2006), inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, cuando las bacterias ingresan en el organismo, son fagocitadas por los neutrófilos y monocitos, son transportadas por la vía hematogena a los sinusoides del hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, donde se multiplican en los macrófagos. La aparición de la enfermedad depende de la capacidad del huésped para restringir esta multiplicación (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2013). La infección puede persistir en los ganglios linfáticos durante un corto tiempo, sin embargo, no puede absorberse de forma permanente ya que no se originan localizaciones en el útero, pero si produce lesiones lo cual pone en peligro la vida del feto y futuras gestaciones de igual manera no permanece en ubres no maduras, en vacas adultas no preñadas suelen ocurrir localizaciones en la ubre o útero. Las ubres infectadas son clínicamente normales, pero tienen gran importancia

como fuente de reinfección del útero, son fuente de infección para los terneros y el hombre que injiere la leche sin ser sometida a pasteurización (Henderson, B, 1988).

Escobar (2001) menciona que la sustancia eritritol producida por el feto es responsable de estimular el crecimiento de la *Brucella abortus*, ocurre en concentraciones muy elevadas en la placenta y líquidos fetales y quizá depende de ella la localización de la infección en estos tejidos, al producirse la invasión del útero grávido las lesiones se inician en la pared del órgano dando lugar a endometriosis del útero ulceroso grave de los espacios situados entre los cotiledones placentarios a la vez que son invadidos inmediatamente, después con destrucción subsecuente de las vellosidades, llegando a producirse aborto hasta el último trimestre de gestación.

Henderson, B (1988), menciona que la bacteria, tiene predilección decidida por el útero grávido, testículos, glándulas sexuales masculinas, ubres, accesorios, cápsulas articulares y ganglios linfáticos. En seguida de la invasión inicial la localización se produce en los ganglios linfáticos que drenan la zona.

Las especies de *Brucella* son patógenas intracelulares facultativas, propiedad que las mantiene protegidas de la acción de los antibióticos y de los mecanismos dependientes de anticuerpos. Esta capacidad de supervivencia intracelular determina el curso ondulante de la enfermedad, su tendencia a presentar recaídas y evolucionar a formas crónicas (MSPN, 2013).

2.2.4. Estructura

Las cuatro especies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, presentan en fase lisa “smooth” (S).

Lipopolisacárido (LPS) consta de una parte glicolípida (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacárida expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo o “core”, más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO) (Moreno, Jones , & Berman, 1984) El PSO es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la

estructura antigénica más expuesta (Díaz & Léviex, 1972) y blanco de anticuerpos (Ac) protectores (Estein, 2006).

Por otro lado, el PSO posee epitopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolítica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O:157 H7 responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de Ac hacia este Ag (Cherwonogrodzky *et al.* 1990 citado Estein, 2006).

La estructura del LPS de cepas rugosas (R-LPS), es básicamente similar al S-LPS, excepto por la cadena O, que está ausente o reducida a unos pocos residuos. Por lo que, la especificidad del R-LPS estará determinada por el polisacárido del núcleo (Merino, s.f.).

2.2.5. Respuesta Inmunológica

Las inmunoglobulinas o anticuerpos son un tipo de proteínas plasmáticas producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas las mismas que pueden ser una amenaza para el organismo: como químicos, virus, esporas o toxinas de las bacterias. Se encuentran en el suero y tejidos del cuerpo. Existen 5 tipos: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM (Drutz y Graybill, 2002).

Un animal infectado con *B. abortus* o vacunado con S19, desarrolla básicamente cuatro tipos de inmunoglobulinas (Ig): IgG1, IgG2, IgM e IgA (Nielsen, D. Kelly, & García, 1992).

En un animal infectado la IgM (aguda) es la primera en aparecer y alcanzar altos niveles para luego disminuir en el tiempo. Por su lado la IgG1 (crónica) aparece un poco más tarde pero su nivel es alto y se prolonga más en el tiempo. En un animal vacunado también hay respuesta de inmunoglobulinas IgG e IgM, pero a los 6 meses de aplicada la vacuna, ya no hay rastros de la IgG2 y solo quedaran IgM e IgG1 en bajos niveles (Nielsen *et al.* 1992).

2.2.6. Diagnóstico

Aunque se debe suponer la presencia de brucelosis bovina en caso de signos clínicos como abortos, es necesario realizar la confirmación con pruebas serológicas y confirmatorias que de un resultado confiable sobre la presencia o no de la enfermedad (OIE, 2017).

2.2.6.1. Prueba Rosa de Bengala (RB)

La prueba RB, es una reacción de aglutinación sobre lámina, que utiliza por un lado un antígeno constituido de una suspensión de *B. abortus* cepa 99 inactivadas y coloreadas por rosa de bengala, en un medio tamponado pH $3,5 \pm 0,05$, y por otro lado el suero a analizar (Ron, 2003).

Existe la presencia de resultados falsos negativos, relacionados con casos iniciales o tardíos de la infección, los resultados falsos positivos, son causados por anticuerpos originados por: la S19, reacciones cruzadas, y la falla en la ejecución de la prueba (Blood, 1987).

Gall & Nielsen (2004) manifiestan que la sensibilidad de la prueba es de 81,2% y la especificidad es de 86,3%.

2.2.6.2. Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo (“SAT”)

Esta prueba, basada también en la aglutinación de una suspensión de *Brucella* inactivadas, enfrenta, por un lado, una cantidad constante de antígeno de una suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%, y por otro, diluciones crecientes de suero a investigar. Pone en evidencia las IgM, y en menos grado IgG, y puede ser empleada para detectar infecciones agudas, los títulos de los anticuerpos presentes en el suero, son reportados de forma cuantitativa (Bercovich, 2000).

Dentro de las desventajas de esta prueba, se encuentran: reacciones cruzadas con otras bacterias, así como a la vacunación. En etapas crónicas de la infección existen resultados falsos negativos Blood (1987). Se puede observar el fenómeno de prozona (resultados negativos en las primeras diluciones, y positivos en los siguientes), debido al exceso de Ac bloqueantes, que impiden la unión de los Ac aglutinantes con el Ag (Ron, 2003).

El porcentaje de sensibilidad de la prueba es de 75,9% y la especificidad es de 95,7% (Gall & Nielsen, 2004).

2.2.6.3. Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol “SAT 2-Me”

La prueba es una variación de la prueba de “SAT” con una cantidad constante de antígeno de una suspensión de *B. abortus* 1119-3 al 4,5%, la prueba utiliza la solución de 2-mercaptoetanol este reactivo, tiene como función reducir las uniones disulfuro de las IgM (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación & Organización Mundial de la Salud, 1986).

La prueba 2-mercaptoetanol presenta un porcentaje de sensibilidad de 88,4% y 91,5% de especificidad (Gall & Nielsen, 2004).

2.2.7. Reacciones cruzadas

Las bacterias del género *Brucella* son patógenos debido a su carácter intracelular, están en la facultad de generar inmunidad humoral y celular, las pruebas diagnósticas que detectan Anticuerpos contra LPS liso poseen la desventaja de producir reacciones falso-positivas con varias bacterias Gram negativas (Moriyón y López-Goñi, 2000).

Las bacterias Gram, negativas que poseen derivados de las moléculas de perosamina en el LPS son responsables de la actividad antigénica cruzada que se observa con *Escherichia hermanni* y *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* O:1. *Yersinia enterocolitica* O:9, y otras que posee una cadena O muy próxima a la de *B abortus*, con N-formil-perosamina. Su reacción cruzada es la más intensa, y la única que hay que tener en cuenta en el diagnóstico en áreas en las que exista tal (Moriyón y López-Goñi, 2000). Poniendo en evidencia que la erradicación de la enfermedad está asociada con las reacciones cruzadas.

2.2.8. Prevención

La prevención ha estado básicamente enfocada en la vacunación de animales, que para el caso de la brucelosis bovina existen dos tipos: S19 y RB-51, que presentan ventajas y desventajas que ocasionan dudas en su uso.

2.2.8.1. Vacunación

Corbel (2006) menciona que el medio más efectivo y confiable de control de la brucelosis en bovinos, ovinos y caprinos es la vacunación; sin embargo, la vacuna ideal aún no existe.

2.2.8.1.1. Vacuna S19

Es una cepa de baja virulencia, útil para inducir inmunidad protectora en el ganado y su efectividad varía dependiendo de la edad, dosis, vía de inoculación y prevalencia en predios vacunados (Nicoletti, 1990).

La S19 de *B. abortus* (S19) es una de las vacunas más ampliamente utilizadas. Las ventajas son una protección de por vida y un bajo costo; pero los abortos pueden ocurrir cuando se inyectan altas dosis, y, más raramente, los terneros pueden infectarse permanentemente (Olsen, S. C. & Stoffregen, W. S., 2005).

La vacuna S19 tiene la desventaja de producir anticuerpos aglutinales que interfieren tanto en las pruebas de aglutinación, así como en pruebas de unión primaria dificultando la erradicación de la brucelosis. (Blood, 1987).

Los anticuerpos producidos por la vacuna S19, generan reacciones cruzadas en las pruebas de diagnóstico, principalmente con las de aglutinación rápida en placa, lo cual es causado por la presencia de anticuerpos contra el LPS-O, inducidos por la S19 (Vargas, 2002).

2.2.9. Control

Para librar de esta enfermedad a una explotación ganadera la única forma, es a través de la ejecución de un programa sanitario apropiado, que contemple medidas sanitarias de

manejo en la finca, vacunación y exámenes serológicos periódicos, para: diagnosticar, identificar y eliminar los animales infectados (AGROCALIDAD, 2009).

La eliminación de los animales enfermos, la vigilancia epidemiológica, la vigilancia sanitaria en camales y mataderos, el control de la movilización de animales, las pruebas serológicas y las campañas de educación sanitaria son indispensables en un programa de control (AGROCALIDAD, 2009).

Para lograr la erradicación se debe insistir en que la detección de animales positivos a las pruebas serológicas, tiene que ir seguida del sacrificio de los reactores positivos. Esta decisión imperativa de eliminar los reactores es la que define la marcha de una campaña nacional de erradicación, sin ella solo se puede efectuar un diagnóstico de situación de la enfermedad, pero no se avanza en el control (AGROCALIDAD, 2009).

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

Mixto, ya que presenta componentes cualitativos y cuantitativos. Cualitativos debido a que la interpretación de la prueba diagnóstica RB presentó o no aglutinación; y se considera un enfoque cuantitativo dado que en la prueba “SAT y SAT-2Me” se realizó titulación, además, se determinó las características de sensibilidad y especificidad en porcentajes.

3.1.2. Tipo de Investigación

Explicativo debido a que nos permite discutir la hipótesis planteada mediante la revisión de literatura de revistas científicas y libros validados.

3.2. HIPÓTESIS

H0: Las pruebas diagnósticas (RB, “SAT”, y su variante “SAT-2Me”) NO detectan anticuerpos post-vacunales luego de la aplicación de la vacuna S19.

HA: Las pruebas diagnósticas (RB, “SAT”, y su variante “SAT-2Me”) detectan anticuerpos post- vacunales luego de la aplicación de la vacuna S19.

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1: Definición y Operacionalización De Variables

Hipótesis.	Variable.	Definición conceptual de la variable.	Dimensión.	Indicadores.	Técnica.	Instrumento.
Las pruebas diagnósticas (RB, "SAT", y su variante "SAT-2Me") detectan anticuerpos post-vacunales debido a la vacuna S19.	VI: Situación epidemiológica de la provincia.	Epidemiológica: estudia los factores y las enfermedades existentes en poblaciones.	Prevalencia en la provincia del Carchi.	1,97%-10,62%. (Agrocalidad, 2009)	Observación	Registros bibliográficos.
		Vacuna: preparación biológica que proporciona inmunidad adquirida activa ante una enfermedad.	Sexo. Diagnóstico a brucelosis. Edad. C-19 dosis vacunal.	Hembra. Negativo. 3-8 meses. $5 \text{ a } 8 \times 10^{10}$	Observación Observación Observación	Registros. Registros. Registros. Ficha técnica.
	Sensibilidad. VD: Características de las pruebas diagnósticas sensibilidad (se) y especificidad (sp). Especificidad.	Se. Designa la probabilidad de obtener un test positivo en un individuo portador de la enfermedad.	% de Sensibilidad.	Sensibilidad $Se = \frac{A}{A + C} * 100$	Observación	RB, "SAT", y "SAT-2Me".
		Sp. designa la probabilidad de obtener un test negativo en un individuo que no es portador de la enfermedad.	% de Especificidad.	Especificidad $Sp = \frac{D}{B + D} * 100$	Observación	
Análisis estadístico: Curva Operativa Del Receptor (ROC).	Área bajo la curva.	0 y 1 (0% y 100%) (Hanley, 1982).	Observación			

Elaborado: Autora.

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

3.4.1. Procedimental

Campo:

- Selección de 117 animales en la Parroquia El Carmelo pertenecientes a la Asociación Rancheros del Norte en UPAs con registros sanitario y de vacunación, en el Cantón Tulcán Provincia del Carchi.
- A un grupo de animales donde se iba a realizar la vacunación con S19, se realizó un diagnóstico previo para determinar el estatus sanitario del animal (contra brucelosis)
- La extracción de sangre de la vena coccígea se realizó de manera semanal durante diez meses, utilizando vacutainers tapa roja de 5ml y la respectiva aguja.
- Las muestras fueron transportadas al laboratorio en un cooler refrigerante.

Diagnóstico de laboratorio:

- RB.
- “SAT”.
- “SAT-2Me”.

3.4.2. Laboratorio

3.4.2.1. Ejecución del ensayo de Rosa de Bengala

Según la OIE (2009) el protocolo de ejecución de la prueba RB es el siguiente:

1. Colocar la placa de vidrio limpia y seca sobre el aglutinoscopio.
2. Con micropipeta automática apoyada sobre la placa de vidrio, se depositó 30 µl de suero. Utilizar un tipo para cada suero.
3. Con micropipeta descargar 30 µl de antígeno próximo a la gota del suero,

4. Mezclar bien, con mezclador de alambre o acrílico, el suero con el antígeno abarcando una superficie circular aproximada de 2 cm de diámetro.
5. Se retira la placa de vidrio y se imprimen movimientos en forma rotativa durante 4 minutos a razón de 10 a 12 movimientos por minuto. Esto se puede hacer en forma manual o con rotadores diseñados especialmente.
6. Finalizados los 4 minutos y rotando la placa sobre la caja de lectura o aglutinoscopio con la luz encendida, se procede a la lectura sobre fondo blanco.
7. Para la interpretación de resultados, se consideran: positivas cuando se forman grumos, aun siendo finos (no confundir con aglutinaciones inespecíficas producidos por impurezas, hemólisis, entre otros). Estas muestras deben someterse a las pruebas confirmatorias; y negativas cuando la mezcla suero-antígeno es de turbidez homogénea y sin grumos. Se considera una muestra sospechosa cuando la aglutinación mínima o aglutinación baja en función del tiempo (OIE, 2009). (Ver anexo 2).

3.4.2.2. Prueba de Aglutinación Lenta en Tubo “SAT” y “SAT-2Me”

Según la OIE, (2009) el protocolo de ejecución de la prueba “SAT” y “SAT-2Me” es el siguiente:

1. Descongelar y mezclar bien los sueros utilizando vortex mixer.
2. Llevar las muestras de suero y de antígeno a temperatura ambiente 22 ± 4 °C.
3. Garantizar la homogeneización del antígeno, agitando suavemente por inversión durante 10 minutos (No usar vortex)
4. Por cada muestra de suero problema positivo a “BPA” o RB, colocar en una gradilla 2 hileras de 4 tubos de 13 x 100 mm cada una.
5. Identificar el primer tubo de cada hilera con el número correspondiente al suero problema. Una de las hileras se destina a la prueba de mercaptoetanol y se marca con una M. La otra hilera, en la que se hará la prueba en tubo, se marca con una T.
6. Por cada muestra de suero debidamente identificada, se utilizó tubos en los cuales se descarga con micropipeta 80 µl de suero en el fondo del primer tubo, 40 µl se distribuyen en el segundo tubo, 20 µl en el tercero y 10 µl en el cuarto.
7. Repetir el procedimiento descrito para depositar las mismas cantidades de suero en la segunda fila.

8. Incluir un suero control positivo y negativo conocido y un control de soluciones sin suero.
9. Con una jeringa, dispensador automático o con pipeta de 10 ml, agregar 1 ml de solución de 2-mercaptoetanol (0,1 M) en cada tubo de hileras M y mezclar muy bien agitando la gradilla.
10. Con una jeringa, dispensador automático o con pipeta de 10 ml, agregar 1 ml de solución salina fenolada al 0,5% a cada uno de los tubos de las hileras T.
11. Dejar las gradillas con las mezclas durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ y posteriormente agregar a cada tubo 1 ml de antígeno de tubo diluido al 2% (0,09%) en solución salina fisiológica (OIE, 2009).
12. Para la interpretación de resultados, se consideran: el grado de aglutinación en cada una de las distintas diluciones puede clasificarse como completo.
Aglutinación completa: es aquella en que el líquido de la mezcla suero-antígeno aparece límpido, translúcido y la agitación suave no rompe los grumos.
Aglutinación incompleta: es la que muestra la mezcla suero-antígeno parcialmente turbia y una suave agitación no rompe los grumos. Aglutinación negativa: es aquella en que la mezcla suero-antígeno aparece turbia y una suave agitación no revela grumos (OIE, 2009) (Ver Anexo 4).

La lectura e interpretación de resultados de la prueba aglutinación lenta en tubo en presencia de 2 mercaptoetanol (“SAT-2Me”), debe realizarse bajo los mismos estándares que la prueba aglutinación lenta en tubo (“SAT”).

3.4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con la finalidad de determinar las características de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas se realizó el análisis descrito por Cañadas de la Fuente (2010). Como muestra la tabla 2.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad.

		Diagnóstico conocido		
		Presente	Ausente	
Prueba diagnóstica	Positivo	A	B	A + B
	Negativo	C	D	C + D
		A + C	B + D	N

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A + C} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{B + D} * 100$$

Además, para determinar cuál de las pruebas es la mejor se realizó un análisis de Curva Operativa del Receptor como lo menciona Hanley (1982) al indicar que la curva ROC es una representación e interpretación del área bajo una curva característica de operación del receptor (ROC) obtenida por el método de "clasificación", o por predicciones matemáticas basadas en las características del paciente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

Una vez analizado los datos mediante la estadística mencionada y mediante la curva ROC se obtuvieron los siguientes resultados.

4.1.1. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas RB, “SAT” y “SAT-2Me”

En la tabla 3 se observa la comparación de resultados para las pruebas RB, “SAT” y “SAT-2Me”.

Tabla 3. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas RB, “SAT” y “SAT-2Me” en animales vacunados con S19.

RB	PRUEBAS		Observaciones (n=117)
	“SAT”	“SAT-2Me”	
+	+	+	24
+	+	-	7
+	-	-	6
-	+	+	3
-	+	-	9
-	-	+	1
-	-	-	47
+	-	+	13
S	+	-	1
S	-	+	1
S	-	-	5

RB: Prueba Rosa de Bengala, **“SAT”:** prueba Aglutinación Lenta en Tubo, **“SAT-2-Me”:** prueba Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2-Mercaptoetanol, **S:** sospechosa.

Elaborado: Autora.

Se puede observar 24 animales son positivos para las dos pruebas y la variante; 7 fueron positivas para RB y “SAT” y negativas a “SAT-2Me”; 6 se mostraron positivas a RB y negativas a “SAT” y “SAT-2Me”, 3 fueron positivas a “SAT” y “SAT-2Me” y negativas a RB, 9 fueron positivas a “SAT” y negativas a RB y “SAT-2Me”; 1 fue positiva a “SAT-2Me” y negativa a “SAT” y RB; 13

muestras fueron positivas a RB y “SAT-2Me”, pero negativa a “SAT”; 47 fueron negativas a las dos pruebas y la variante.

4.1.2. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200

Se exhibe los resultados de la prueba diagnóstica “SAT” con sus cuatro diluciones: 15 muestras fueron positivas a la diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200; 7 fueron positivas a 1/25, 1/50, 1/100 y negativas a la dilución 1/200; 8 fueron positivas a las diluciones 1/25, 1/50 y negativas a las diluciones 1/100 y 1/200; 13 tuvieron resultado positivo a la a dilución 1/25 y negativos a las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200; 73 fueron negativas a las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200; 1 muestra fue negativa a la dilución 1/25 y positiva a las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200, tal como lo muestra la tabla 4.

Tabla 4. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200, en animales vacunados con S19.

“SAT”				Observaciones (n=117)
1/25	1/50	1/100	1/200	
+	+	+	+	15
+	+	+	-	7
+	+	-	-	8
+	-	-	-	13
-	-	-	-	73
-	+	+	+	1

“SAT”: Aglutinación Lenta en Tubo

Elaborado: Autora.

4.1.3. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT-2Me” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200

Los resultados de la prueba diagnóstica Aglutinación “SAT-2Me” con sus cuatro diluciones, en tanto 14 muestras indican resultados positivos las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200; 13 fueron positivas a las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y negativas a la dilución 1/200; 8 fueron positivas a las diluciones 1/25, 1/50 y negativas a las diluciones 1/100 y 1/200; 7 fueron positivas a la dilución 1/25 y negativas a las diluciones 1/50, 1/100 y 1/200; 74 presentaron resultados negativos a las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200; 1

muestra fue negativa a la dilución 1/25, negativa a las diluciones 1/50 y 1/100 y negativa a la dilución 1/200. (Ver tabla 5).

Tabla 5. Resultado comparativo de las pruebas diagnósticas “SAT-2Me” con las diluciones 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 en animales vacunados con S19.

“SAT-2Me”				Observaciones (n=117)
1/25	1/50	1/100	1/200	
+	+	+	+	14
+	+	+	-	13
+	+	-	-	8
+	-	-	-	7
-	-	-	-	74
-	+	+	+	1

“SAT-2Me”: Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol
Elaborado: Autora.

4.1.4. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica RB para brucelosis bovina en animales vacunados con S19

En la tabla 6 se puede observar que la prueba diagnóstica RB presenta una sensibilidad del 100%, especificidad de 59,4%; en animales con estatus de vacunación y sanitario conocido, además, se presentaron 7 muestras sospechosas.

Tabla 6. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica RB para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.

		ENFERMEDAD	
		+	-
RB	+	9	41
	-	0	60
Sensibilidad 100%			
Especificidad 59,4%			

RB: Rosa de Bengala
Elaborado: Autora.

4.1.5. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT” para brucelosis bovina en animales vacunados con S19

Podemos observar en la tabla 7 la prueba diagnóstica “SAT” presenta una sensibilidad del 100%, especificidad de 67,6%.

Tabla 7. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT” para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.

		ENFERMEDAD	
		+	-
“SAT”	+	9	35
	-	0	73
Sensibilidad 100,0%			
Especificidad 67,6%			

“SAT”: Aglutinación Lenta en Tubo.

Elaborado: Autora.

4.1.6. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT-2Me para brucelosis bovina en animales vacunados con S19

En la tabla 8 se observar a la prueba diagnóstica “SAT-2Me”, la misma, que presenta una sensibilidad del 88,9%, y especificidad de 68,5%.

Tabla 8. Estimación de sensibilidad y especificidad para la prueba diagnóstica “SAT-2Me para brucelosis bovina en animales vacunados con S19.

		ENFERMEDAD	
		+	-
“SAT-2-Me”	+	8	34
	-	1	74
Sensibilidad 88,9%			
Especificidad 68,5%			

“SAT-2Me”: Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol

Elaborado: Autora.

4.1.7. Comparación de las curvas ROC para RB, “SAT” y “SAT-2Me”. Se muestra área bajo la curva de las gráficas generadas para cada prueba

Se comparó la capacidad discriminativa de las pruebas diagnósticas RB, “SAT” y “SAT-2Me”, siendo el Área Bajo la Curva (ABC) de la prueba diagnóstica RB de 74,5% (IC95%); el ABC de la prueba diagnóstica “SAT” de 83,8% (IC95%) y 73,1% (IC95%) de la prueba diagnóstica “SAT-2Me”, como se muestra en la tabla 9 y figura 1.

Tabla 9. Comparación de las curvas ROC para RB, “SAT” y “SAT-2Me”. Se muestra el área bajo la curva de las gráficas generadas para cada prueba, en animales vacunados con S19.

Pruebas Diagnósticas	Área	Error estándar	Significación	95% IC Límite inferior	95% IC Límite superior
Prueba RB	0,745	0,051	0,015	0,646	0,845
Prueba “SAT”	0,838	0,042	0,001	0,755	0,921
Prueba “SAT 2-Me”	0,731	0,085	0,021	0,565	0,898

Elaborado: Autora.

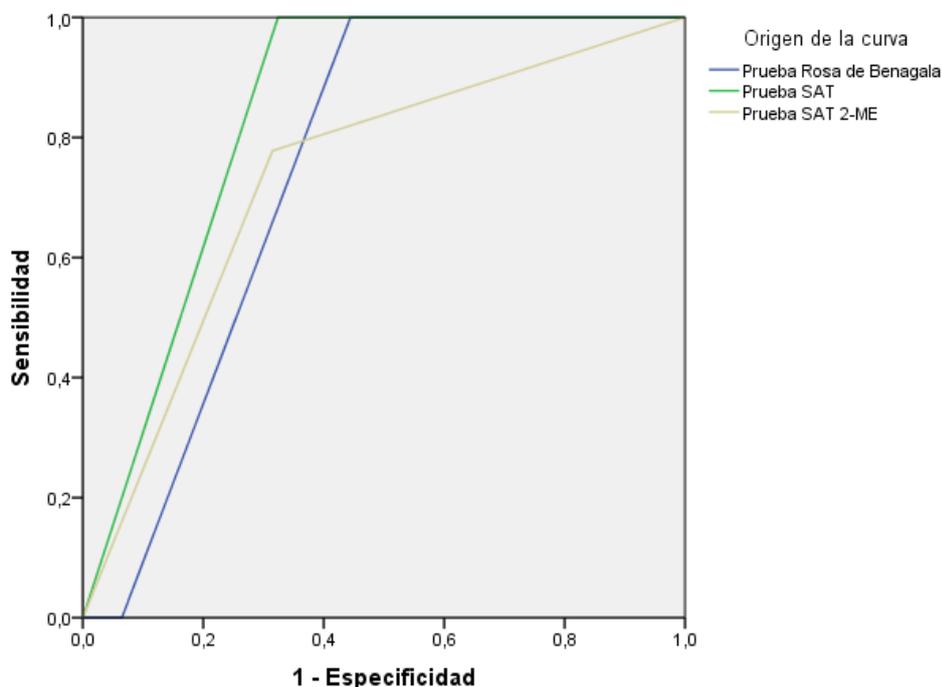


Figura 1: Comparación de curvas ROC

Elaborado: Autora.

4.2. DISCUSIÓN

La brucelosis posee un sinnúmero de pruebas diagnósticas de las cuales se necesita una prueba inequívoca para el diagnóstico de brucelosis, ya que, muchas de estas presentan inconvenientes al presentar resultados falso positivos y falso negativos.

En la tabla 3 se observa la comparación entre las dos pruebas diagnósticas y la variante, se obtuvieron muestras que fueron positivas a las dos pruebas diagnósticas y la variante (RB, “SAT”, “SAT-2Me”) atribuido a que se basan en el mismo principio de aglutinación sobre

lámina, lo cual fue descrito de igual forma por Ron (2003) manifestando que las dos pruebas diagnósticas y la variante utilizan el principio de aglutinación utilizando un antígeno constituido de una suspensión de *B. abortus*.

Se obtuvieron muestras que fueron positivas a RB y “SAT” y negativas a la prueba “SAT-2Me”, debido a que RB y “SAT” son capaces de detectar IgM e IgG como lo menciona Allan, 1976; Beh, 1974; Levieux, 1974, citados por Bercovich, (2000) donde escribe que la prueba “SAT” pone en evidencia las IgM, y en menos grado IgG; y Castro *et al.* (2005) menciona que la prueba RB detecta IgM pero en mayor grado IgG1.

Se presentaron muestras positivas a RB y negativas a las pruebas “SAT” y “SAT-2Me”, debido a que la prueba RB presenta una alta sensibilidad como lo ratifica Aparicio *et al.* (2003) donde describe que la prueba RB es una buena prueba tamiz, la cual, presenta una alta sensibilidad; sin embargo, al momento de diferenciar los animales vacunados de los infectados, su capacidad es mala.

Tres muestras fueron positivas a “SAT” Y “SAT-2Me” y negativas a la prueba RB debido a que las dos muestras poseen el mismo protocolo de ejecución como lo menciona Ariza (2002) donde indica que la prueba “SAT-2Me” es una variación de la prueba SAT, la misma que utiliza 2-mercaptoetanol como agente reductor.

Nueve muestras fueron positivas a la prueba “SAT” y negativas a las pruebas RB y “SAT-2Me”, debido a que esta prueba tiene la capacidad de detectar en su mayoría IgM, mientras que la prueba RB y “SAT-2Me” detecta más IgG, como lo menciona Ron (2003).

También 1 muestra fue positiva a la prueba “SAT-2Me” y negativa a las pruebas RB y “SAT”, esto atribuido a que es una prueba no estandarizada, por ello obtenemos resultados poco fiables, resultados similares fueron descritos por Ariza (2002) donde menciona que la baja fiabilidad de los resultados obtenidos del “SAT-2Me”, estarían en relación con la calidad de los reactivos, pero principalmente con la estandarización del procedimiento.

Se observó 13 muestras, las mismas, que fueron positivas a las pruebas RB y “SAT-2Me” y negativas a la prueba “SAT”, esto a causa de problemas de ejecución de las pruebas, hemólisis de suero, congelación de suero o a presencia de grasa, resultados similares

fueron descritos por Blood (1987) donde indica que la falla en la ejecución de la prueba ocurre cuando se reporta como positiva un aprueba que contiene grasa o que el suero ha sido sometido por mucho tiempo a congelación.

De los resultados 7 muestras presentaron resultados sospechosos ya que presentaron aglutinación leve o posterior al tiempo reglamentario, los cuales podemos atribuir a la falla de la ejecución de las pruebas, calidad de la muestra, reacciones cruzadas; resultados similares fueron descritos por Blood (1987) donde menciona la presencia de resultados falsos negativos, relacionados con casos iniciales o tardíos de la infección, en tanto que los resultados falsos positivos son causados por la presencia de anticuerpos originados por: S19, reacciones cruzadas, así como falla en la ejecución de la prueba.

Los valores obtenidos en las tablas 4 y 5 indican el análisis de las diluciones para las pruebas de “SAT” y “SAT-2Me”, donde se observó muestras que presentaban resultados positivos en todas las diluciones, pero otras que fueron positivas y a medida que aumentaba las diluciones, los títulos de anticuerpos disminuían haciendo la dilución negativa, esto esta atribuido a que la brucelosis es una enfermedad crónica, lo que hace que a medida que se torna crónica aumenta los anticuerpos de clase IgG no aglutinantes, lo que hace que los títulos de anticuerpos bajen, pudiendo en ciertos casos llegar a resultados de bajo título e inclusive negativos, como lo menciona Castro *et al.* (2005).

Una muestra presentó el fenómeno de prozona el cual, se refiere a que las muestras presentan ausencia de aglutinación en primeras diluciones y aglutinación en los siguientes, lo cual es debido a reacciones en donde existe exceso de antígenos o anticuerpos, inhibiendo la unión de los receptores como lo menciona Ron (2003).

El análisis de la característica de sensibilidad de las pruebas (RB, “SAT” y “SAT-2Me”), todas tienen alto porcentaje de sensibilidad atribuido a que las pruebas se basan en el mismo principio de aglutinación sobre lámina, resultados similares fueron descritos por Ron (2003) donde manifiesta que las dos pruebas diagnósticas y la variante utilizan el principio de aglutinación utilizando un antígeno constituido de una suspensión de *B. abortus*.

De los resultados comparativos de especificidad de las pruebas (RB, “SAT” y “SAT-2Me”) presentan bajo porcentaje de especificidad, lo cual, se debe a que las pruebas dan resultados falso positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias que comparten la cadena O, resultados similares fueron descritos por Moriyón y López-Goñi (2000) siendo las bacterias causantes la bacteria *Escherichia hermanni* y *E. coli O:157*, *Salmonella O:30*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae O:1*. *Yersinia enterocolitica O:9* y otras que posee una cadena O muy próxima a la de *B abortus*. La vacunación con S19 también constituye otra reacción cruzada, como lo describe Ron (2003) donde manifiesta que la vacunación con S19 tiene la desventaja de producir anticuerpos aglutinales que interfieren en las pruebas de aglutinación. En etapas crónicas de la infección existen resultados falsos negativos (Blood, 1987).

En la tabla 9 podemos observar que la prueba diagnóstica “SAT” proporciona un diagnóstico altamente sensible y específico por lo tanto su capacidad discriminativa es alta, debido, a que el área bajo la curva de la prueba es de 83,8%, resultados similares fueron descritos por Cerda y Cifuentes (2011) donde menciona que la curva ROC adopta valores entre 0% y 100%. A medida que el ABC de un test diagnóstico se acerca al valor 1,00 (test diagnóstico perfecto), mayor será su capacidad discriminativa.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Las pruebas en estudio (RB, “SAT” y “SAT-2Me”) son pruebas tamiz que detectan resultados falso positivos en animales vacunados con S19.

La prueba Rosa de Bengala (RB) presentó una sensibilidad del 100%, y especificidad de 59,4% en animales con estatus sanitario y de vacunación conocido.

La prueba Aglutinación Lenta en Tubo (“SAT”) presentó una sensibilidad del 100% y especificidad de 67,6% en animales con estatus sanitario y de vacunación conocido.

La prueba Aglutinación Lenta en Tubo con en presencia de 2 mercaptoetanol (“SAT-2Me”) presentó una sensibilidad del 88,9%, especificidad de 68,5% en animales con estatus sanitario y de vacunación conocido.

La prueba diagnóstica “SAT”, es la que mejor características presenta según el área bajo la curva, con 83,8%, seguida por la prueba RB con un área de 74,5% y la prueba “SAT-2Me” con un área de 73,1%.

Tanto los resultados de las pruebas de sensibilidad, especificidad y curvas ROC permiten concluir que la prueba SAT fue la que mejor comportamiento presentó en el diagnóstico de brucelosis bovina en animales vacunados con S19 en la provincia del Carchi.

5.2. RECOMENDACIONES

A pesar de que en la presente investigación la prueba Aglutinación Lenta en Tubo “SAT” presenta mejor área bajo la curva 83,8%, una sensibilidad de 100% y especificidad de 67.6%, la prueba Rosa de Bengala presenta un área bajo la curva de 74,5% y características de sensibilidad y especificidad similares, por lo que se recomienda como prueba tamiz para el diagnóstico de brucelosis bovina en la provincia del Carchi a la prueba Rosa de Bengala

(RB) ya que además de tener buenas características es una prueba sencilla y bajo riesgo de contaminación.

Se recomienda el uso obligatorio de pruebas confirmatorias altamente específicas para el diagnóstico de brucelosis bovina.

Implementar registros sanitarios que faciliten un diagnóstico e interpretación precisa de resultados para brucelosis bovina.

Se recomienda que se realicen más estudios sobre reacciones cruzadas en las pruebas diagnósticas para el control de brucelosis bovina en la provincia del Carchi, a fin, de mejorar las características de especificidad de las pruebas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Ecuatoriana De Aseguramiento De La Calidad Del Agro Agrocalidad. (2009). *Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina*. Quito: Dirección de Sanidad Animal.
- Alton, G., Jones, L., Angus , R., & Verger, J. (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris.
- Angulo, A. (2006). *Survey Of Bovine Brucellosis In Ecuador: Performance Of Five Diagnostic Tests*. Belgium: Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Department of Animal Health Antwerpen (Antwerp), Belgium.
- Aparicio, A., Díaz, E., Hernández, L., Pérez, R., Alfonseca, E., & Suárez, F. (2003). *Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de Brucella abortus cepa 19*. México.
- Ariza, J. (2002). *Brucelosis: aspectos actuales de principal interés*. Control Calidad SEIMC. Recuperado de http://www.seimc.org/control/revi_Sero/brumcli.htm.
- Bercovich, Z. (2000.). *The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review*. *VeterinaryQuarterly* 22, 123-130.
- Blood, D. (1987). *Enfermedades causadas por diversas especies de Brucella*. In: *Medicina Veterinaria*. nteramericana, México.
- Cañadas De La Fuente, G. R. (2010). *Las Tablas De Contingencia En La Formación De Profesionales De Psicología*. Granada: Universidad De Granada. Recuperado de <http://www.ugr.es/~batanero/pages/articulos/Gustavo2.pdf>
- Castro, H., González, S., y Prat, M. (2005). *Brucelosis: una revisión práctica*. Buenos Aires, Argentina.
- Cerda, J., y Cifuentes, L. (2011). *Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos*. Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Contrina, N., y Fernández, A. (1991). *"brucelosis, problema sanitario y económico"*. Ed. La Habana.
- Corbel, M., & Brinley-Morgan, W. (1984.). *Genus Brucella. Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1*. In: Krieg NR, Holt JG, editor. Bergey's The Williams & Wilkins, Baltimore; pp. 377–388.
- Corbel, M. (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. . WHO-FAO-OIE. Geneva.
- Corbel, M. J. (1997). *Brucellosis: an Overview*. In: *1st International Conference on Emerging Zoonoses. Emerging Infectious Diseases*.

- Díaz, R., & Lévioux, D. (1972). *ôte respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et de immunoglobulines G1 et G2 dans les dággglutin, de de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone.*
- Drutz, D., y Graybill, J. (2002). *Enfermedades Infecciosas. En: Funderberg HH, Stites DP, Cladwell JL, Wells VJ. Manual de Inmunología Clínica, 2da Edición.* México: Editorial El Manual Moderno.
- Escobar, F. (2001). *Incidencia – Prevalencia y Plan de Control de Brucelosis Bovina en Hatos Lecheros de la Sierra Norte Ecuatoriana.* Riobamba: Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Facultad De Ciencias Pecuarias, Escuela De Ingeniería Zootécnica.
- Estein, M. (2006). Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). *REDVET*, 25.
- Gall, D., & Nielsen, K. (2004). *Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison.* Ottawa, Ontario, Canada.
- Gil, A., & Sarmiento, L. (2001). *Brucellosis. In: Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de America Latina. FAO . Livestock Information and Policy Branch, p. 23-29.* Livestock Information and Policy Branch, p. 23-29.
- Gobierno Provincial del Carchi. GPC. (2013). *“Carchi- Prioridades para el Desarrollo – Agenda 2013 – 2020”.* Carchi, Ecuador: GPC.
- Halling, S., & S Boyle, S. (2002). *Foreword (Editorial).* *Vet. Microbiol.* 90,.
- Hanley, (1982). *The meaning and use of the area under the curve a receiver operating characteristic (ROC) curve.* *Radiology.* Recuperado de http://www.med.mcgill.ca/epidemiology/hanley/software/Hanley_McNeil_Radiology_82.pdf.
- Henderson, B. (1988). *Medicina Veterinaria.* 2a. Edit. Interamericana S. A. pp. 4, 16-425.
- Ibarra, M. (2013). *Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el norte de Ecuador.*
- Ministerio de Agricultura y Ganadería - Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria. (1999). *Prevención y control de la brucelosis bovina en el Ecuador, Report.*
- Merino, A. L. (s.f.). *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional.*
- Moreno, E., Jones, L., & Berman, D. (1984). *Immunochemical characterization of rough Brucella lipopolysaccharides.* *Infect Immun.*
- Moriyón, I., y López-Goñi, I. (2000). *Estructura Genética y Fisiología del Género Brucella.* Navarra, Pamplona, España: Universidad de Pamplona.

- Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2013). *enfermedades infecciosas brucelosis guía para el equipo de salud*. República Argentina.
- Muñoz, P., Marín, C., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R., Blasco, J. (2005). *Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to Yersinia enterocolitica O:9*. Saskatoon, Canada: University of Saskatchewan.
- Nicoletti, P. (1990). *Vaccination. In Animal Brucellosis. Nielsen K. and Duncan J.R (Eds.). C.R.C. Press Inc. USA: Boca Raton Fla.*
- Nielsen, K., D. Kelly, W. D., & García., M. (1992). *Enzyme immuno assay. Application to diagnosis of Bovine Brucellosis. Ed. . Canada: Agriculture Canada; pp. 203.*
- Organización de las Naciones Unidas por la Alimentación y la Agricultura & Organización Mundial de la Salud. (1986). *Comité Mixte FAO/OMS d'Experts De La Brucellose. Sixieme Rapport. Organisation Mondiale de la Santé., Genève (Suisse).*
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2004). (OIE) *Chapter 2.3.1. Bovine Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Recuperado: www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00052.htm.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2009). (OIE) *Manual de Diagnósticos serológicos de la Brucella Bovina*.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2017). (OIE) *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2017*.
- Olsen, S. C., & Stoffregen, W. S. (2005). *Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock*. Expert Review of Vaccines 4: 915-928.
- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., y Oñate, A. (2006). *Brucella abortus: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos*. Chile: Recuperado: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2006000100002&script=sci_arttext.
- Ron, J. (2003). *Validación de Técnicas Diagnósticas para la detección de Brucelosis y Estudio epidemiológico en una Región Andina del Ecuador*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/269929264>.
- Schurig, G., Sriranganathan, N., & Corbel, M. (2002). *Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet Microbiol 90*.
- Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria. (2005). *Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria. Convenio marco de Cooperación Técnica entre SESA y la Pasteurizadora Quito S.A. para la certificación de fincas libres de brucelosis bovina*.

- The Center for Food Security & Public Health., Intitute for International Cooperation in Animal Biologics. (2009). *Brucelosis bovina: Brucella abortus*. Iowa. Recuperado de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucella_abortus-es.pdf.
- Vargas, O. (2002). *Brucellosis in Venezuela*. Vet. Microbiol. pp. 39-44.
- Vemulapalli, R., Y, H., Buccolo, L., S Boyle, N Sriranga, s., Boyle, S., & Sriranga, N. (2000). *Complementation of Brucella abortus RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change rough phenotype and attenuation. Infect Immun.*
- World Health Organization. (1997). *The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting with the participation of the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) and the Office International des Epizooties (OIE)*. World Health Organization. Geneva,.

VII. ANEXOS

Anexo 1.

Prueba Rosa de Bengala ejecución del protocolo.



Prueba Rosa de Bengala.

Anexo 2.

Prueba Rosa de Bengala interpretación de resultados



Resultado positivo (+)



Resultado negativo (-)

Anexo 3.

Prueba Aglutinación lenta en tubo “SAT” y su variante Aglutinación Lenta en Tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol interpretación de resultados.



Prueba “SAT”



Prueba “SAT-2Me”

Anexo 4.

Interpretación de resultados para la prueba Aglutinación Lenta en Tubo y su variante.



Resultado positivo (+)



Resultado negativo (-)