

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



## FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

### CARRERA DE DESARROLLO INTEGRAL AGROPECUARIO

Tema: “Evaluación de la especificidad de la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” en bovinos vacunados con cepa anti brucélica 19 en la provincia del Carchi”

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

AUTORA: Yadira Liceth Fuertes Cevallos.

TUTOR: Ing. Marcelo Ibarra M.Sc.

TULCÁN - ECUADOR

2018

## **CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR**

Certificamos que la estudiante Yadira Liceth Fuertes Cevallos con el número de cédula 0401883707 ha elaborado el trabajo de titulación: “Evaluación de la especificidad de la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” en bovinos vacunados con cepa anti brucélica 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.....**

**F.....**

**Ing. Marcelo Ibarra MSc.**

**Ing. David Herrera MSc.**

Tulcán, 18 de junio 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, Yadira Liceth Fuertes Cevallos con cédula de identidad número 0401883707 declaro: que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal. Los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

**F.....**

**Yadira Liceth Fuertes Cevallos**

Tulcán, 18 de junio del 2018

## **ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Yadira Liceth Fuertes Cevallos declaro ser autora de los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “Evaluación de la especificidad de la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” en bovinos vacunados con cepa anti brucélica 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.....**

**Yadira Liceth Fuertes Cevallos**

Tulcán, 18 de junio del 2018

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a mi Dios quién me guio por el camino del bien, por darme fuerza para seguir adelante y no decaer ante los problemas que se presentaban, enseñándome a enfrentar las adversidades y logrando los objetivos deseados.*

*A la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI por darme la oportunidad de estudiar y formarme como una profesional.*

*A mi tutor al Ing. Marcelo Ibarra M.Sc por todos sus conocimientos, sus enseñanzas, tiempo su paciencia y gran capacidad para brindar sus conocimientos. A los lectores Dr. Luis Balarezo e Ing. David Herrera MSc. Por su colaboración y su tiempo brindado durante el desarrollo de esta investigación.*

*De igual manera quiero agradecer al Ing. Hernán Benavides por aportar con su colaboración en la prestación de su finca en el cual se desarrolló el estudio en campo, y por todos sus conocimientos brindados.*

*A todos mis profesores y compañeros de manera especial a dos colaboradores de investigación Dagmar Játiva y Polivio González por compartir sus conocimientos y su apoyo día a día y principalmente por su amistad.*

*Y como no mis más grandes agradecimientos a mi familia por su apoyo incondicional.*

## **DEDICATORIA**

*Dedico este proyecto de investigación a mis padres por su apoyo incondicional que ellos me han brindado, sus consejos, comprensión y amor ellos me ayudaron en los momentos más difíciles y así poder llegar a esta instancia de mis estudios, ellos me han formado como persona con valores, principios, empeño, perseverancia y coraje para conseguir mis sueños y objetivos.*

*A mis hermanas por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar como persona y como profesional.*

*También la dedico a mis sobrinos y sobrina quienes ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ellos.*

*A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.*

## ABREVIATURAS

### Unidades de medida:

<b>mP</b>	Milipolarización	<b>mm</b>	Milímetros
<b>Δ mP</b>	Variación de Milipolarización	<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>μl</b>	Microlitro	<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonias		

### Términos inmunológicos:

<b>Ac</b>	Anticuerpo	<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>Ag</b>	Antígeno	<b>OPS</b>	Polisacárido - O

### Pruebas diagnósticas:

<b>RB</b>	Rosa de Bengala	<b>FC</b>	Prueba de Fijación de Complemento, "Complement Fixation Test"
<b>i- ELISA</b>	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" indirecto, en suero sanguíneo.	<b>"FPA"</b>	Fluorescencia Polarizada
<b>SAT</b>	Sero-aglutinación lenta en tubo	<b>FPA-s</b>	Fluorescencia Polarizada en suero
<b>SAT-2Me</b>	Prueba aglutinación lenta en tubo en presencia de 2 Mercaptoetanol	<b>FPA-c</b>	Fluorescencia Polarizada capilar
<b>BPA</b>	Antígeno Buferado en Placa, "Buffered Plate Agglutination Test"	<b>PAL</b>	Prueba de anillo en leche

<b>IgM</b>	Inmunoglobulinas M	<b>IgG</b>	Inmunoglobulinas G
------------	--------------------	------------	--------------------

**Otras abreviaciones:**

<b>S19</b>	Vacuna cepa 19	<b>RB51</b>	Vacuna RB 51
------------	----------------	-------------	--------------

**Instituciones:**

<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación	<b>PEBB</b>	Programa Oficial de Erradicación de Brucelosis Bovina
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal	<b>AGROCALIDAD</b>	Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro Agrocalidad
<b>MAG</b>	Ministerio de Agricultura y Ganadería	<b>SESA</b>	Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria



## ÍNDICE

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR .....	i
AUTORÍA DE TRABAJO .....	ii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
DEDICATORIA .....	v
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	v
I. PROBLEMA .....	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN .....	4
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos .....	5
1.4.3. Preguntas de Investigación .....	5
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	6
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS .....	6
2.2. MARCO TEÓRICO .....	8
2.2.1. Brucelosis.....	8
2.2.2. Signos y síntomas .....	9
2.2.3. Etiología.....	9
2.2.4. Transmisión de la enfermedad.....	10
2.2.5. Diagnóstico .....	11
2.2.6. Prevención y control .....	14
2.2.7. Vacunación .....	14
III. METODOLOGÍA .....	16
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO.....	16
3.1.1. Enfoque.....	16
3.1.2. Tipo de Investigación.....	16
3.2. HIPÓTESIS O IDEA A DEFENDER .....	16
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	17

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS .....	18
3.4.1. Procedimental .....	18
3.4.2. Laboratorio.....	18
3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	20
3.4.1.1. Estadístico descriptivo .....	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
4.1. RESULTADOS .....	21
4.1.1. Funcionalidad de la vacuna S19 mediante la prueba “FPA” .....	21
4.1.2. Resultados de la prueba “FPA” en animales vacunados con S19.....	22
4.2. DISCUSIÓN .....	24
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	26
5.1. CONCLUSIONES .....	26
5.2. RECOMENDACIONES.....	26
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	I
VII. ANEXOS.....	V

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Definición y operacionalización de variables .....	17
Tabla 2. Resultados e Interpretación de Resultados .....	19
Tabla 3. Resultados de la prueba “FPA” en animales vacunados con S19.....	22
Tabla 4. Diagnóstico Serológico.....	27

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Signos y síntomas de brucelosis bovina .....	9
<i>Figura 2:</i> Etiología brucelosis .....	10
<i>Figura 3:</i> Modo de transmisión de brucelosis bovina .....	11
<i>Figura 4:</i> Prueba de anillo en leche .....	12
<i>Figura 5:</i> Prueba Rosa de Bengala .....	12
<i>Figura 6:</i> Prueba "FPA" .....	14
<i>Figura 7:</i> Prevención y control de brucelosis bovina .....	14
<i>Figura 8:</i> Funcionalidad de la vacuna S19 .....	21
<i>Figura 9:</i> Vacuna S19.....	V
<i>Figura 10:</i> Kit FPA.....	VI

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la especificidad de la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” en bovinos vacunados con S19 en la Provincia del Carchi, se consideró 6 terneras de entre 3 y 8 meses de edad, a las cuales luego de un diagnóstico serológico con la prueba c-ELISA, y confirmando que están negativas a brucelosis bovina, se inmunizó con la vacuna S19, y se procedió a tomar muestras sanguíneas semanales durante 39 semanas. Luego del análisis de laboratorio con la prueba en estudio “FPA” se determinó que la especificidad de esta a la semana 26 es del 100%. Además, mediante el análisis estadístico descriptivo el tiempo óptimo post vacunación para el diagnóstico serológico con “FPA” de animales vacunados con S19 es de 6,5 meses post vacunación, ya que se reducen los resultados falsos positivos atribuidos a la vacuna con S19.

**Palabras clave:** brucelosis, s19, fluorescencia polarizada

## ABSTRACT

In order to evaluate the specificity of the Fluorescence Polarized Assay FPA in cattle vaccinated with S19 in the Province of Carchi, 6 calves between 3 and 8 months of age were considered, which were confirm as negative for bovine brucellosis using the c-ELISA test. The sampling scheme was carried out weekly for 39 weeks, taking samples from the caudal coccigeal vein. After the laboratory analysis the specificity of FPA was determined in 100% at 26 weeks, before that false positive results due to vaccination with S19 was considered. In addition, by means of the descriptive statistical analysis, the optimal post vaccination time for the serological diagnosis with "FPA" of animals vaccinated with S19 is 6.5 months' post vaccination, where false positive results attributed to the vaccine with S19 are reduced.

**Key words:** brucellosis, s19, fluorescence polarized

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis en los bovinos es una enfermedad infecciosa causada por *Brucella abortus*, que principalmente afecta a las hembras bovinas en edad reproductiva, es caracterizado por abortos, metritis, nacimientos de animales débiles y la disminución de la fertilidad, sin embargo otras especies de animales pueden ser afectadas, causando grandes pérdidas económicas. Los machos también pueden ser infectados y en ellos la enfermedad se muestra con alteraciones testiculares, con la pérdida de fertilidad debido a la orquitis y epididimitis. Esta patología, se transmite al hombre, constituyéndose una zoonosis de distribución mundial (Ancha y Zsyfres, 2003 citado por Ramires , Ernst, & Elvinger, 2009).

En el caso de los animales, es muy fácil la contaminación vía oral, ya que en el momento del parto las vacas tienden a lamer el feto o descargas genitales causadas durante el parto. La infección en las crías ocurre en el útero o cuando consumen la leche infectada. Una forma de transmisión indirecta es el contacto con los animales, el consumo de pastos contaminados o agua, entre otros (Villareal, 2016 citado por Martínez Barreno, 2017).

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) a través de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro – AGROCLAIDAD- lanzó el Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis bovina, donde uno de los componentes de este programa es el diagnóstico serológico, y que para el caso de la brucelosis existen un sinnúmero de pruebas serológicas para el diagnóstico de esta enfermedad, pero una sola no es suficiente para diagnosticar animales enfermos o sanos (AGROCALIDAD, 2008).

Existen muchas pruebas para el diagnóstico de brucelosis, pero casi todas ellas no discriminan animales vacunados de animales infectados por ende van a arrojar resultados falso positivos debido a la vacunación (Gutiérrez, Lutzelschwab, Díaz, & Estein, 2014).

Según Godfroid, Nielsen, & Saegerman, (2010) la prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” se basa en un principio físico: la rapidez con que una molécula gira en un medio líquido se correlaciona con su masa, moléculas de pequeño tamaño giran más rápido y despolarizan un haz de luz polarizada más, mientras que las moléculas más grandes giran

más lentamente y en consecuencia, despolarizan menos luz. El “FPA” mide el grado de despolarización en unidades de milipolaridad (mP), en presencia de anticuerpos contra *Brucella spp.* Esta prueba puede ser fácilmente automatizada y es muy rápida, ya que después de mezclar el antígeno marcado y el suero la lectura es casi instantánea. La sensibilidad a la prueba parece ligeramente inferior a los de i-ELISA. La especificidad varía entre 98,8 % y 99,0 %. Además, esta prueba ya se utiliza en los programas de control y certificación de la brucelosis en América del Norte y Europa.

Los "falsos positivos" en las reacciones se deben a varias causas, tales como anticuerpos residuales por la vacunación con cepa 19 y reacciones cruzadas debidas a anticuerpos originados por bacterias que tienen lipopolisacáridos superficiales similares a los de *Brucella*. Como se menciona una pequeña proporción de animales especialmente los vacunados a una edad tardía pueden mantener anticuerpos aglutinantes que persisten durante mucho tiempo. Las reacciones en estos casos se deben a la inmunoglobulina M, ya que la IgG 2 generalmente desaparece rápidamente y la IgG 1 es poca activa en la prueba y además su concentración se reduce al poco tiempo después de la vacunación. El origen de muchas reacciones inespecíficas del bovino no se conoce. Se ha comprobado que hay una relación antigénica entre *Brucella* y *Escherichia coli* y con *Yersinia enterocolitica* (Szyfres, 2015).

La prueba de “FPA” es una prueba nueva en Ecuador y que no ha sido utilizada para el diagnóstico de brucelosis bovina, por ende, la presente investigación tiene por objetivo evaluar la especificidad de la prueba “FPA” en animales vacunados con S19 en la provincia del Carchi, donde a decir de Ron (2003), Angulo (2006) e Ibarra (2013), la vacunación se realiza de forma indiscriminada y sin el uso de registros.

## I. PROBLEMA

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas y zoonosicas de los animales tienen un impacto fuerte sobre la salud pública, economías nacionales y medios de vida. La brucelosis es una enfermedad infecciosa de origen bacterial que afecta tanto al humano como a diferentes especies de animales. Actualmente la brucelosis es considerada como una enfermedad de distribución mundial (Díaz, Hernandez, Valero, & Arellano, 2000).

Hay muchas pruebas para el diagnóstico de brucelosis, la mayoría de ellas no discriminan a los animales vacunados de animales infectados por lo tanto van a arrojar resultados falsos positivos debido a la vacunación. Atribuido, a que la mayoría de pruebas detectan anticuerpos contra la cadena O de lipopolisacárido que son inducidos por la vacunación (Gutiérrez, Lutzelschwab, Díaz, & Estein, 2014).

Según Pool *et al.*, (2004) la prueba de ELISA es capaz de medir anticuerpos IgG1, aunque estén en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas, además que puede discriminar animales vacunados de aquellos naturalmente infectados, pero ciertos autores mencionan que el ELISA da resultados falsos positivos de hasta 6 meses post vacunación. Esta prueba como diagnóstico de confirmación es buena solo que es altamente costosa para los ganaderos, además esta prueba tiene que ser realizada por personal altamente capacitado, y con el uso de equipos especializados.

La vacunación en la provincia del Carchi – Ecuador se realiza indistintamente con las dos cepas (S19 y RB-51), además se vacuna mal, se vacuna a cualquier edad, además que no se llevan registros. Por ende, si se realiza el diagnóstico serológico a brucelosis y no se tiene registros de vacunación, los animales van a ser considerados como positivos siendo estos falsos positivos.

La prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” es una técnica recomendada por la OIE, al igual que c-ELISA, para el diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina, pero para el caso del Ecuador es una prueba nueva y de la cual no se tiene estudios, tanto de sensibilidad como de especificidad, aplicada a un contexto en donde la vacunación se



realiza de forma indiscriminada y sin en el uso de registros, lo que dificulta la interpretación de resultados especialmente aquellos relacionados con la especificidad de la prueba.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿La prueba de Fluorescencia Polarizada detecta anticuerpos post vacunales en animales vacunados contra brucelosis con S19?

## **1.3. JUSTIFICACIÓN**

Según Agurto & Fernández, (2013) la importancia que representa la brucelosis está dada principalmente por las pérdidas económicas que ocasiona en la producción pecuaria, al causar abortos, metritis, infertilidad, nacimiento de animales débiles y baja en producción de leche, entre otros.

Esta enfermedad es ampliamente estudiada en todo el mundo por el gran peligro que tiene para la salud humana, ya que es una zoonosis extremadamente infecciosa (Cabrera, Silva, & Izquierdo, 2005).

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, (2009) las pruebas que existen para la confirmación de brucelosis son ELISA competitiva “c-ELISA”, Fijación de Complemento “FC”, y Fluorescencia Polarizada “FPA”, pero las 2 primeras pruebas confirmatorias tienen el inconveniente que son costosas requieren personal capacitado a diferencia del “FPA”.

El “FPA” es una prueba nueva en Ecuador y por ende se desconoce si esta tiene la capacidad de discriminar anticuerpos luego de la vacunación con S19, esta prueba puede ser ejecutada en un laboratorio simple o en el campo. Es rápido de fácil ejecución, requiere volúmenes menores de suero y no es afectado por la hemólisis. Además, la literatura menciona que es capaz de distinguir animales vacunados de no vacunados, aunque no exista una explicación razonable para este fenómeno (Samartino, Schust, Piazza, Salustio, & Conde, 2007).

Según Agurto & Fernández, (2013) en su investigación indican que este ensayo de Fluorescencia Polarizada “FPA” permiten medir anticuerpos infecciosos contra *B. abortus* en bovinos, además también ha sido desarrollada y validada para realizarse en otras especies como porcinos, ovinos, caprinos, bisontes y ciervos. Esta prueba posee varias ventajas sobre otras técnicas serológicas, incluyendo la relación costo efectividad, velocidad, simplicidad y adaptación de su uso a campo.

El “FPA” es un ensayo homogéneo, que no requiere etapas de lavado de los componentes que no han reaccionado. Se puede realizar en un formato de 96 pocillos o en un formato de tubo. El formato del tubo se puede utilizar en el campo para el diagnóstico rápido (Nielsen, 2010).

#### **1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

##### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar la especificidad del FPA en bovinos vacunados con S19 en la Provincia del Carchi.

##### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- 1.- Evaluar la funcionalidad de la vacuna S19 mediante la prueba “FPA”.
- 2.-Definir la especificidad del “FPA” en animales vacunados con S19
- 3.-Determinar el tiempo óptimo post vacunación para el diagnóstico serológico mediante “FPA” de animales vacunados con S19.

##### **1.4.3. Preguntas de Investigación**

¿En qué semana el “FPA” no detecta anticuerpos post vacunales?

¿Por qué da resultados positivos al inicio y negativos al final de vacunación?

## II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Según Gutiérrez *et al.*, (2014) menciona en su investigación que esta prueba de diagnóstico de confirmación de Fluorescencia Polarizada es muy buena para el diagnóstico de anticuerpos anti *B. abortus* en suero de ganado con la adaptación para su uso en microplacas y comparación con ensayos de aglutinación convencional, el objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones para el uso de un antígeno comercialmente para el ensayo de “FPA” en un formato de microplacas de 96 pocillos y comparar su desempeño de diagnóstico con la aglutinación convencional. Se obtuvieron muestras de suero de 149 vacas y 20 toros pertenecientes a hatos libres e infectados de diferentes regiones de Argentina. Dos diluciones de suero y antígeno y se detectó la Fluorescencia Polarizada con un lector multimodo. Los resultados obtenidos de este ensayo el “FPA” conducido usando antígeno y suero a una dilución de 1: 100 fue tan eficiente como la prueba usando antígeno a 1:20 y suero a 1:10. El 8 % de las muestras fueron resultado sospechoso en la prueba de aglutinación resultó negativo en “FPA”.

Según Giménez, Barcos, & Moran, (2007) en el ensayo sobre brucelosis técnica de Fluorescencia Polarizada para estar seguros. Muestra que se utilizaron 30.015 muestras de suero bovino procedente de establecimientos de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, San Luis, La Pampa, Chaco y Formosa, que ingresaban al laboratorio para controles de rutina, saneamiento, traslados, certificación y recertificación. Como pruebas diagnósticas se utilizaron las técnicas de, BPA, SAT 2-ME, según el manual de procedimientos de la red de laboratorios del SENASA. El antígeno de BPA y SAT provenía del Laboratorio Biológico de Tandil. Para la técnica de “FPA” se siguieron las instrucciones del Manual de la OIE, utilizando el antígeno de Diachemix. Para ese ensayo las muestras se leyeron en un lector de luz polarizada, modelo Sentry 100. Se utilizaron sueros controles de referencia positivos y negativos. Los resultados de este ensayo son los siguientes en las diferentes pruebas que se realizó por la técnica de SAT/2-ME se detectaron 970 positivos y 423 por “FPA”. Por lo tanto, 547 sueros (56,39 %) fueron positivos por SAT/2. Los resultados del procesamiento permiten observar que un porcentaje de animales que fueron catalogados como reaccionantes a brucelosis por las técnicas de SAT/2-ME, son realmente negativos cuando se los procesa por “FPA”. La

decisión de utilizar “FPA” en reemplazo del SAT y 2-ME como prueba de confirmación, presenta otras ventajas como procesar muestras hemolizadas, rapidez del ensayo, simplicidad del ensayo, fácil interpretación del ensayo, validación internacional del mismo, no posee toxicidad.

Según Sánchez *et al.*, (2011) en su investigación realizó un protocolo serológico de Fluorescencia Polarizada en el estudio de anticuerpos contra *Brucella* spp en humanos. El objetivo de la investigación es mostrar el desarrollo y alcance de un método de análisis serológico basado en la técnica de Fluorescencia Polarizada “FPA” a partir de una gota de sangre obtenida mediante punción capilar, se realizó la determinación de anticuerpos anti brucelosis de un conjunto de 321 personas de alto riesgo laboral, en los resultados de la investigación se encontró relación parcial entre los ensayos de FPA-s y FPA-c, donde se observa que sólo 6 de 9 pacientes previamente positivos a esta prueba, fueron confirmados por ELISA-c y FPA-s. Encontrándose relación perfecta entre estas dos últimas, en donde se engloba la data correspondiente a la validez, seguridad y coeficiente de verosimilitud.

Según Wiener , Iwuniak, Slotnicka, & Szulowski, (2010) en su investigación de diagnóstico de la brucelosis bovina utilizando técnicas serológicas tradicionales y ensayo de Fluorescencia Polarizada muestran que el objetivo de este estudio fue la aplicación de un ensayo de Fluorescencia Polarizada “FPA” para el examen de sueros bovinos y la comparación de los resultados del ensayo con los resultados de la prueba de Rosa de Bengala “RB”, la prueba de Aglutinación Sérica “SAT” prueba de Fijación de Complemento “FC” y ELISAs. Seiscientos treinta y cinco sueros de bovinos, incluidos 300 sueros de animales sanos, 32 sueros de animales considerados serológicamente positivos para la brucelosis y sacrificados y 303 sueros procedentes de investigaciones confirmatorias. Todos los sueros procedentes de animales sanos, negativos en ELISA, RB, SAT y FC fueron también negativos en “FPA”. Entre los 303 sueros de las investigaciones confirmatorias, 269 fueron positivos en RB y SAT, 21 fueron positivos en SAT y 13 restantes fueron RB-positivos solamente. Sólo dos sueros, uno positivo en ambas pruebas (RB, SAT) y uno SAT-positivo, también fueron positivos en “FPA”. Entre los 32 sueros procedentes de animales considerados serológicamente positivos, que reaccionaron en RB, SAT y FC, los resultados es que todos los sueros procedentes de animales sanos fueron negativos en ELISA, RB, SAT y FC. En el “FPA”, todas las muestras permanecieron negativas. Entre los sueros positivos para ELISA, 13 fueron también positivos en “FPA”

con un valor de mP comprendido entre 129,4 y 178,1. Una muestra restante, que era “FPA”-negativa dio como resultado un valor de mP de 89,4. Todas las muestras, positivas en SAT, RB y FC, pero negativas en ELISA, también fueron negativas en “FPA”.

Según Ramírez *et al.*, (2007) en su investigación sobre aplicación del ensayo de Fluorescencia Polarizada para detección de anticuerpos caprinos a *Brucella melitensis* en áreas de alta prevalencia y vacunación amplia en el presente estudio se realizó para comparar los resultados de las pruebas aprobadas por la OIE RB, BPA, FC y “FPA” en la detección de anticuerpos *Brucella* en muestras de suero de cabra procedentes de un área de alta prevalencia y vacunación generalizada, utilizando una combinación de i-ELISA y c-ELISA para clasificar los sueros de cabra de un área de alta prevalencia y vacunación generalizada y evaluar la combinación de la prueba. Utilizando pruebas fáciles de realizar como pruebas de detección y una prueba confirmatoria secundaria para detectar muestras positivas. En los resultados se compararon los resultados de diferentes series de pruebas.

## **2.2. MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1. Brucelosis**

Según Corbel, (2006) la brucelosis, también conocida como "fiebre ondulante", "fiebre mediterránea" o "fiebre de Malta", es una zoonosis y la infección es casi invariablemente transmitida por contacto directo o indirecto con animales infectados o sus productos.

La brucelosis es el resultado de la infección por varias especies de *Brucella spp*, una bacteria Gram negativa, cocobacilos intracelulares facultativos o varilla corta en la familia *Brucellaceae*. Seis especies se encuentran en animales: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Se han encontrado una o más especies de *Brucella* sin nombre en mamíferos marinos. Los nombres formales propuestos para los aislados de mamíferos marinos son *B. maris* para todas las cepas, o *B. pinnipediae* para cepas de pinnípedos (focas, leones marinos y morsas) y *B. cetaceae* para cepas de cetáceos (ballenas, marsopas y delfines). Algunas especies de *Brucella* contienen biovares. Se han reportado cinco biovares para *B. suis*, tres para *B. melitensis* y hasta nueve para *B. abortus* (The Center Food Security, & OIE, 2009).

En el humano, esta enfermedad puede ser causada por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*. Las vacunas vivas para *B. abortus* y *B. melitensis*, *B. canis* (una cepa menos virulenta utilizada como antígeno para pruebas serológicas), también son patógenas para los seres humanos. *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. suis* no se han relacionado con enfermedades humanas (The Center Food Security, & OIE, 2009).

### 2.2.2. Signos y síntomas

El signo más predominante en vacas preñadas es el aborto, el nacimiento o término de terneros muertos o débiles. El aborto se produce en la segunda mitad de la preñez, con retención de placenta, y otras consecuencias son la metritis, esta puede ser causa de infertilidad permanente, también se estima que la infección ocasiona pérdidas de 20 % a 25 % en la producción de leche (Ancha & Szyfres, 2001).



**Figura 1:** Signos y síntomas de brucelosis bovina

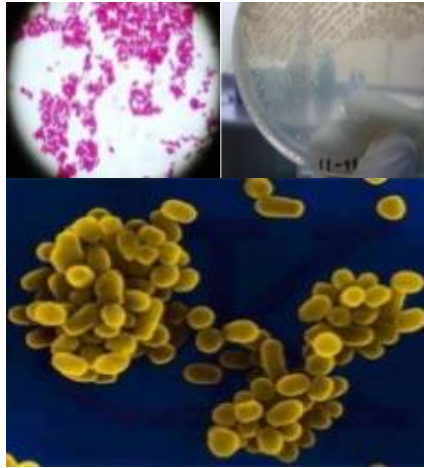
**Fuente:** Recuperado de <https://bit.ly/2Mk5sen>

### 2.2.3. Etiología

La bacteria de genero *brucella* se presenta con la forma de coco-bacilos con un tamaño de 0,5- 0,7 micras por 0,6-1,5 micras de crecimiento lento estas no tienen capsulas ni forman esporas son Gram-negativas no esporuladas sin flagelos. Este es un patógeno intracelular “facultativo” se puede decir que tiene la capacidad de establecer una infección en el huésped (Solís Salas, 2008).

La Brucella es una bacteria Gram-negativa que puede presentarse bajo cultivo con una morfología de colonia lisa o rugosa. Los organismos lisos tienen moléculas de tipo

polisacáridos (LPS) en donde contienen una cadena polisacárida conocida como la cadena “O”, mientras que los organismos rugosos carecen de esta cadena. La presencia del LPS con una cadena O en la S19 explica la aparición y persistencia de anticuerpos en el suero, después de la administración de esta vacuna (AGROCALIDAD, 2008).

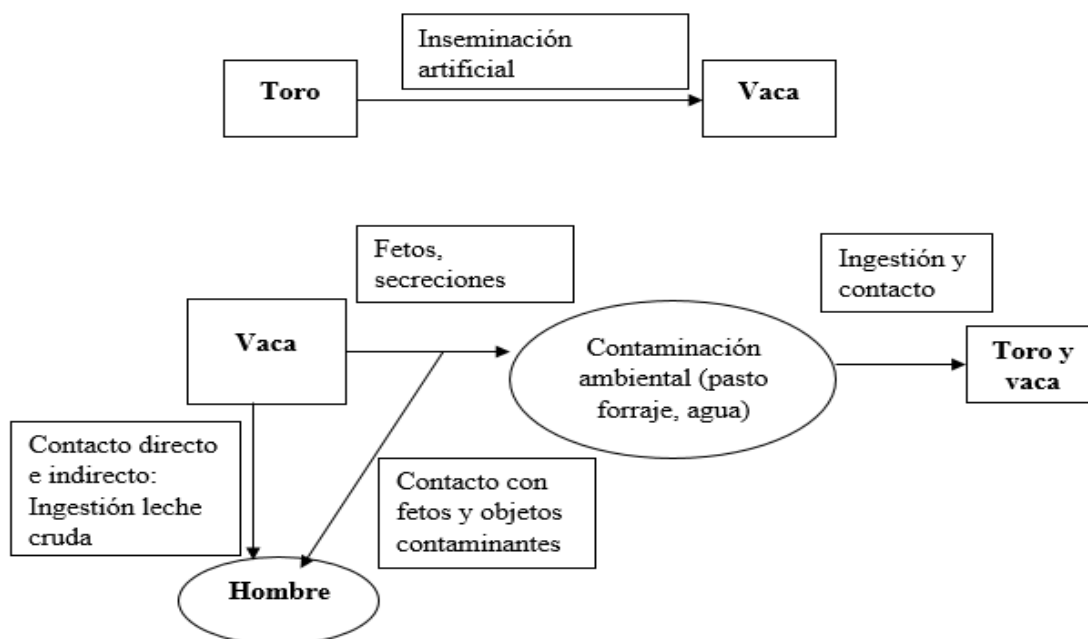


**Figura 2:** Etiología brucelosis

**Fuente:** Recuperado de <https://bit.ly/213L7hf>

#### **2.2.4. Transmisión de la enfermedad**

La principal fuente de infección en los bovinos son los fetos o descargas vaginales que tienen un gran número de brucelas. La vía de invasión más usual en los bovinos es el tracto gastrointestinal, por el consumo de forrajes o agua contaminada, en la inseminación artificial cuando no se conoce la calidad de semen que se va a utilizar. Así mismo, las vacas tienen el hábito de lamer membranas fetales y terneros recién nacidos. En mínima cantidad, pueden favorecer a la contaminación de materias fecales de terneros que se alimentan de leche contaminada, ya que no todas las brucelas se destruyen en el tracto digestivo. En el hombre también existe la transmisión por contacto directo con los animales, fetos u otros contaminantes que constituyen una fuente de infección, o por contacto indirecto por la ingestión de alimentos contaminados no pasteurizados (leche cruda) (Figura 1) (Ancha & Szyfres, 2001).



*Figura 3.* Modo de transmisión de brucelosis bovina

**Fuente:** Ancha & Szyfres, 2001

### 2.2.5. 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).

#### 2.2.5.1. Diagnóstico Clínico

El diagnóstico clínico no es de gran utilidad ya que no hay signos patognomónicos, el aborto se produce en diferentes animales y es necesario realizar pruebas de laboratorio para confirmar la presencia serológica y el agente etiológico (Pozo & Noroña, 2011).

#### 2.2.5.2. Diagnóstico Serológico

Es el elemento de elección para el diagnóstico de brucelosis bovina ya que se han desarrollado diferentes técnicas de laboratorio de una suficiente especificidad y sensibilidad unidas a un bajo costo y rapidez de realización que las hacen muy adecuadas

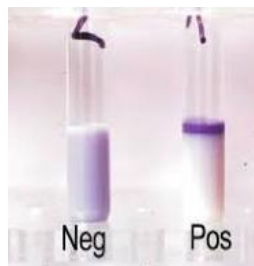


para esta función. Esto permite realizar gran cantidad de muestras en poco tiempo, además no requieren gran cantidad de inversión en tecnologías. Con este tipo de diagnóstico lo que se detecta son anticuerpos (IgM, IgG1 e IgG2) y por este tipo de pruebas no se pueden reconocer las clases de anticuerpos, pero si el predominio de alguno de estos. Se basa en el principio de aglutinación de los anticuerpos con antígeno a pH bajo y se divide en dos tipos de pruebas (Pozo & Noroña, 2011).

1. Pruebas primarias o de screening
2. Pruebas secundarias o de confirmación

#### 2.2.5.2.1. Pruebas primarias o de screening

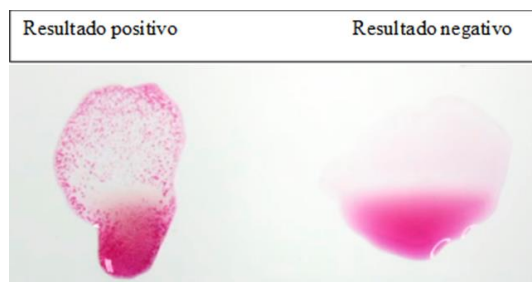
**Prueba de anillo en leche:** La Prueba del Anillo en Leche “PAL” pertenece al grupo de pruebas indirectas empleadas en el diagnóstico presuntivo de la enfermedad, dado que detecta anticuerpos aglutinantes anti brucela frente a la fracción O de la cadena de lipopolisacáridos de la membrana externa del agente etiológico (Acosta & Ortiz, 2010).



*Figura 4:* Prueba de anillo en leche

**Fuente:** Recuperado de <https://bit.ly/2sOQgxY>

**Rosa de Bengala:** Esta prueba se basa en la inhibición, inactivación de algunas aglutininas inespecíficas a pH bajo. Es cualitativa muy sensible que detecta IgG1 y su positividad va persistir por mucho tiempo (Ortiz & Acosta, 2000).



*Figura 5:* Prueba Rosa de Bengala

**Fuente:** Recuperado de <https://bit.ly/2l2XpGs>

#### 2.2.5.2.2. Pruebas secundarias o de confirmación

- **“ELISA”**

Esta técnica es altamente sensible, específica, versátil y es ampliamente utilizado en medicina veterinaria para el diagnóstico de diferentes enfermedades. El principio de esta prueba se basa en un anticuerpo monoclonal único, el cual compite diferencialmente con los anticuerpos producidos en la respuesta a la vacunación con S19, infección por *B. abortus* de campo u otros factores no específicos para un epitope o determinante antígeno específico en el LPS de *B. abortus* (Pozo & Noroña, 2011).

- **Prueba de Fluorescencia Polarizada (“FPA”)**

Según Godfroid, Nielsen, & Saegerman, (2010) se basa en un principio físico como es la rapidez con que una molécula gira en un medio líquido y se correlaciona con su masa, moléculas de pequeño tamaño giran más rápido y despolarizan un haz de luz polarizada más, mientras que las moléculas más grandes giran más lentamente y, en consecuencia, despolarizan un haz de luz polarizada menos. El “FPA” mide el grado de despolarización en unidades de milipolaridad (mP). Durante el ensayo, las muestras de suero se incuban con un antígeno específico de *B. abortus* marcado con isotiocianato de fluoresceína. En presencia de anticuerpos contra *Brucella spp.*, Se forman grandes complejos fluorescentes. En muestras negativas, el antígeno permanece sin complejos. Estas moléculas más pequeñas giran más rápidamente y por lo tanto provocan una mayor despolarización de la luz que las muestras positivas para *Brucella spp.*

Esta prueba puede ser fácilmente automatizada y es muy rápida, ya que después de mezclar el antígeno marcado y el suero la lectura es casi instantánea. La sensibilidad a la prueba parece ligeramente inferior a los de i-ELISA. La especificidad varía entre 98,8 % y 99,0 %. Esta prueba ya se utiliza en los programas de control y certificación de la brucelosis en América del Norte y Europa. La OIE considera esta prueba como una "prueba prescrita para comercio (Godfroid, Nielsen, & Saegerman, 2010).

La mayor fortaleza del “FPA” es la capacidad de diferenciación entre anticuerpos vacunales de aquellos de origen infecciosos, bajo el programa de vacunación de terneras

con la S19. No obstante, también se destaca su elevada especificidad, simplicidad y rapidez en relación a otros test como ELISA competitivo o seroaglutinación (Meglia, *et al.*, 2011).



**Figura 6:** Prueba "FPA"

### 2.2.6. Prevención y control

Es importante la aplicación de estrategias como la regionalización, inmovilización de los animales, identificación, trazabilidad y principalmente la vacunación como estrategias para la prevención, estas son acciones sanitarias económicamente viables para los ganaderos. En las zonas donde la brucelosis es endémica suele utilizarse la vacunación para reducir la incidencia de la infección. Cuando está cerca de lograr la eliminación de la enfermedad es preciso aplicar un programa de pruebas diagnósticas y sacrificios sanitarios para erradicarla por completo (SENASA, & OIE, 2009).



**Figura 7:** Prevención y control de brucelosis bovina

### 2.2.7. Vacunación

En todo hato ganadero deben mantener un esquema establecido de vacunación. Esta se debe realizar en hembras entre 3 y 6 meses de edad. En nuestro país están registradas en AGROCALIDAD las vacunas S19 que esta se la realiza una sola vez a diferencia de la RB-51 que requiere de revacunación (AGROCALIDAD, 2008).

### **2.2.7.1. La vacuna S19**

Esta se caracteriza por qué es una vacuna viva, atenuada derivada a partir de una cepa virulenta de *Brucella* de morfología lisa. Es una cepa de baja virulencia, es utilizada para promover inmunidad protectora en el ganado y su efectividad varía dependiendo de la edad, dosis, vía de inoculación entre otras (Nicoletti, 1990 citado por Rojas, 2005).

Esta vacuna ha sido utilizada para todos los programas de prevención y erradicación de la brucelosis bovina, cada dosis contiene  $10-60 \times 10^9$  ufc (2 ml) que se presenta comercialmente en forma liofilizada (AGROCALIDAD, 2008).

### **2.2.7.2. La vacuna RB-51**

Esta vacuna se desarrolló a partir de la cepa lisa virulenta S-2308, para obtenerse la mutante RB-51, ya que es una cepa rugosa estable, carente de la cadena lateral "O". Esta característica evita la producción de anticuerpos serológicos aglutinantes, detectables por pruebas oficiales de laboratorio. Se debe administrar 2 ml por vía subcutánea a hembras bovinas de cualquier edad, su mayor ventaja es que no presenta reacciones aglutinogénicas y su desventaja es el alto costo por dosis que se debe revacunar cada año (AGROCALIDAD, 2008).

## **III. METODOLOGÍA**

### **3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO**

#### **3.1.1. Enfoque**

Cuantitativo, porque la prueba de diagnóstico de brucelosis “FPA” provee resultados numéricos.

#### **3.1.2. Tipo de Investigación**

Explicativa, debido que esta nos permite analizar y discutir la hipótesis planteada mediante la revisión de literatura y los resultados obtenidos se van a comparar con otros autores.

### **3.2. HIPÓTESIS O IDEA A DEFENDER**

H1. Los títulos post vacunales influyen sobre la especificidad del “FPA”

H0. Los títulos post vacunales no influyen sobre la especificidad del “FPA”

### 3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**Tabla 1. Definición y operacionalización de variables**

<b>Hipótesis</b>	<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual de la variable</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Técnica</b>	<b>Instrumento</b>
Los títulos post vacunales influyen sobre la especificidad del “FPA”	V. I Vacunación	Una vacuna es una preparación biológica que proporciona inmunidad adquirida activa ante una determinada enfermedad	Requisitos vacunación S19	Sexo Edad Estudio sanitario Dosis vacunal	Observación	registros
	VD Tiempo post-vacunal Especificidad	Probabilidad para que un sujeto sano obtenga un resultado negativo, la capacidad para detectar a los sanos.	Tiempo en semanas post-vacunal  Especificidad animales vacunados	20-30semanas ELISA. 96.9-100% (Nielsen, 2010)	Observación	Fluorescencia polarizada

**Elaborado por.** Autora

### **3.4. MÉTODOS UTILIZADOS**

#### **3.4.1. Procedimental**

Primero se seleccionó 6 hembras en una edad de 3 - 8 meses aproximadamente que se verificó mediante registros.

Se les realizó un diagnóstico con la prueba de confirmación c-ELISA previo a la vacunación para confirmar que las terneras eran negativas a brucelosis y posteriormente aplicar la vacuna.

Para la inmunización se administró 2 ml de la vacuna S19 por vía subcutánea en la tabla del cuello utilizando aguja estéril para cada animal (anexo 1).

El muestreo se lo realizó semanalmente, a partir de los 8 días después de la vacunación, estas fueron tomadas de la vena caudal coccígea, las mismas que se recolectaron en tubos vacutainer, y fueron llevadas al laboratorio en refrigeración con gel.

Luego se realizó el diagnóstico serológico de las muestras en el laboratorio de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi.

#### **3.4.2. Laboratorio**

Para la prueba “FPA” se utilizó el kit FPA en donde utiliza un extracto de polisacárido-O (OPS) de la bacteria *B. abortus* conjugado con fluoresceína.

##### **3.4.2.1. Procedimiento de prueba “FPA”**

1. Se pipeteó 20 µl de muestras y controles en los tubos.

Se realizó los Controles Negativos por triplicado.

2. Se pipeteó 1 ml del diluyente de muestra en todos los tubos. Se mezclaron con cuidado.

3. Se incubó de 3-30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se obtuvo lecturas en blanco de todas las muestras y controles.
5. Se agregó 10 µl del antígeno y se mezcló con cuidado.
6. Se incubó durante 3-5 minutos a temperatura ambiente
7. Se obtuvo lecturas de mP de todas las muestras y controles (OIE, 2008).

Para la validación de la prueba se tiene en cuenta lo siguiente

1. El control negativo debe leer entre 70 y 90 mP.
2. El control positivo debe leer entre 120 y 250 mP.
3. En caso de que el control negativo esté fuera del rango, ajuste el instrumento para leer el control medio negativo a  $80 \pm 5$  mP.
4. Si se ajusta el control negativo, y el control positivo está fuera del rango, la prueba se considera inválida (OIE, 2008).

De igual forma para la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta lo siguiente:

Calcule los valores de  $\Delta$  mP para cada muestra restando el control negativo promedio mP de la muestra mP. Los resultados de la prueba se interpretan de acuerdo con la siguiente tabla.

$$\Delta mP = (\text{muestra mP} - \text{promedio control negativo mP})$$

**Tabla 2. Resultados e Interpretación de Resultados**

Negativo	Sospechoso	Positivo
$\leq 10$	10-20	$>20$

(OIE, 2008)

Las muestras positivas y sospechosas se deben volver a analizar por duplicado. Si las lecturas de los duplicados son iguales o inferiores a 10  $\Delta$  mP, la muestra se reporta como



negativa. Si alguna de las repeticiones es superior a  $10 \Delta$  mP, la muestra se reporta como positiva. Los valores de corte pueden variar de un país a otro, para el uso diferente o el estado de vacunación de los animales (OIE, 2008) (anexo 2).

### **3.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.4.1.1. Estadístico descriptivo**

El nivel descriptivo está referido al estudio y análisis de los datos obtenidos en una muestra (n) y como su nombre lo indica describen y resumen las observaciones obtenidas. Ya que se va a describir el tiempo post vacunación que el “FPA” no detecta anticuerpos vacunales, así como su especificidad en porcentaje.

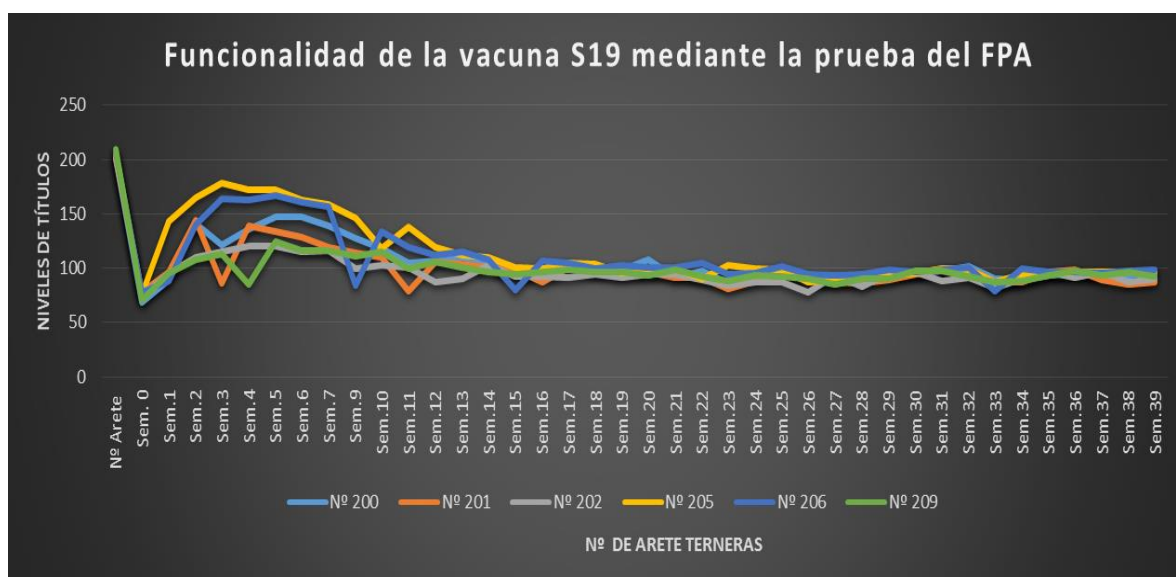
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RESULTADOS

Luego de analizar los datos se obtuvo los siguientes resultados.

#### 4.1.1. Funcionalidad de la vacuna S19 mediante la prueba “FPA”

Se puede observar que a la semana 0 los títulos de anticuerpos son cero, pero luego de aplicar la vacuna, estos crecen significativamente hasta la semana 6, para luego ir decreciendo, pero manteniéndose en el tiempo, como lo muestra la figura 2.



**Figura 8.** Funcionalidad de la vacuna S19

**Fuente:** Datos obtenidos en campo

**Elaborado por:** Autora

#### 4.1.2. Resultados de la prueba “FPA” en animales vacunados con S19

Como se observa en la tabla 3 a partir de la semana 0 todos los resultados son negativos, al pasar de la semana 1 ya se encuentran positivos, sospechosos y todavía algunos negativos, pero a partir de la semana 26 (6,5 meses) la prueba de diagnóstico de confirmación “FPA” da resultados negativos en animales vacunados con S19, repitiéndose consecutivamente por 3 semanas. Luego de la semana 29 nuevamente siguen apareciendo resultados sospechosos, pero sin mostrar resultados positivos. Con el análisis de esta información se determinó que la especificidad de la prueba “FPA” es del 100 % a las 26 semanas post vacunación con S19.

**Tabla 3. Resultados de la prueba “FPA” en animales vacunados con S19**

	N.- Arete						Total de número de casos		
	200	201	202	205	206	209	Negativo	Sospechoso	Positivo
Sem. 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sem.1	0	2	2	1	0	2	2	3	1
Sem.2	1	1	1	1	1	1	0	0	6
Sem.3	1	0	1	1	1	1	1	0	5
Sem.4	1	1	1	1	1	0	1	0	5
Sem.5	1	1	1	1	1	1	0	0	6
Sem.6	1	1	1	1	1	1	0	0	6
Sem.7	1	1	1	1	1	1	0	0	6
Sem.9	1	1	2	1	0	1	1	1	4
Sem.10	1	1	2	1	1	1	0	1	5
Sem.11	2	0	2	1	1	2	1	3	2
Sem.12	1	1	0	1	1	1	1	0	5
Sem.13	1	2	0	1	1	2	1	2	3
Sem.14	2	2	2	1	1	2	0	4	2
Sem.15	2	2	0	2	0	0	3	3	0
Sem.16	2	0	0	2	1	2	2	3	1
Sem.17	2	2	0	1	2	2	1	4	1
Sem.18	2	2	0	2	2	2	1	5	0
Sem.19	2	0	0	0	2	2	3	3	0
Sem.20	1	2	0	2	2	0	2	3	1
Sem.21	0	0	0	2	2	2	3	3	0
Sem.22	2	0	0	0	2	0	4	2	0
Sem.23	0	0	0	2	0	0	5	1	0
Sem.24	2	0	0	2	0	0	4	2	0
Sem.25	2	2	0		2	0	2	3	0

Sem.26	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Sem.27	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Sem.28	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Sem.29	0	0	0	0	2	0	5	1	0
Sem.30	2	0	2	2	2	2	1	5	0
Sem.31	2	2	0	2	2	2	1	5	0
Sem.32	2	2	0	2	2	0	2	4	0
Sem.33	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Sem.34	0	0	0	0	2	0	5	1	0
Sem.35	0	2	2	2	2	0	2	4	0
Sem.36	0	2	0	2	2	2	2	4	0
Sem.37	0	0	2	2	2	0	3	3	0
Sem.38	0	0	0	2	2	2	3	3	0
Sem.39	0	0	0	2	2	0	4	2	0

**En donde**

0 = Negativo

1 = Positivo

2 = Sospechosos

**Fuente.** Datos obtenidos en laboratorio

**Elaborado por:** Autora

## 4.2. DISCUSIÓN

De los análisis realizados con la prueba de diagnóstico de confirmación “FPA” se obtuvieron resultados que a la semana 0 no existen niveles de anticuerpos porque esta semana es previa a la vacunación, pero después de unos días de la vacunación existen niveles muy altos de anticuerpos por la aparición pronta de la inmunoglobulina IgM y luego de la IgG, como fue descrito de igual forma por Nielsen & Col, (1996) citado por Pino, (2000) manifestando que luego de la vacunación con S19 los LPS que forman parte de la membrana externa de la envoltura celular de la bacteria, que producen la respuesta inmune mediante los linfocitos. En las cuales sus efectores son las inmunoglobulinas que comprende las proteínas que posee actividad de anticuerpo, siendo estas la inmunoglobulina M (IgM) que aumenta rápidamente es decir de 3 a 7 días después de la vacunación, y alcanza su máxima concentración a la 3- 4 semana, y que al pasar el tiempo las concentraciones de las inmunoglobulinas en el suero se van reduciendo, pero sin desaparecer por varios meses. Así mismo, Cuenca, (2012) indica que la inmunoglobulina G (IgG) aparecen después de la IgM, llegando a su mayor concentración de los 28 a 42 días después de la vacunación. Estas inmunoglobulinas disminuyen antes de la IgM a partir de los 6 meses después de la vacunación.

La prueba de Fluorescencia Polarizada “FPA” arroja resultados positivos hasta la semana 25, pero a partir de la semana 26 por tres semanas consecutivas arroja resultados negativos, para luego dar resultados sospechosos. La razón por la que se muestran resultados positivos a “FPA” hasta la semana 25 se debe a reacciones cruzadas por la vacunación, debido a que existen niveles muy altos de anticuerpos luego de la vacunación por la aparición pronta de la inmunoglobulina IgM y luego de la IgG, como fue descrito de igual forma por Nielsen & Col, (1996) citado por Pino, (2000). Los resultados negativos a partir de la semana 26 hasta la 29 se debe a que existe un principio físico como es la rapidez con que una molécula gira en un medio líquido se correlaciona con su masa, como hay menor concentración de anticuerpos el principio de unión antígeno anticuerpo se forman moléculas de tamaño pequeño que como dice el principio de la prueba giran más rápido y despolarizan un haz de luz mayor esto fue mencionado por Godfroid, Nielsen, & Saegerman, (2010).

Además a partir de la semana 29 aparecen resultados sospechosos que se pueden atribuir a problemas con la calidad de los sueros, estrés del animal, los reactivos o por el

congelamiento y descongelamiento, entre otros como lo menciona Castillo, (2012) que indica que se deben mantener las muestras refrigeradas con un empaque adecuado para conservarlas por debajo de los 20 a 30 °C hasta su llegada al laboratorio. De la misma manera, el Ministerio de Agricultura de Chile, (2013) indica que las muestras a procesar y el Kit de FPA deben estar a temperatura ambiente al momento de realizar los análisis, además de que se debe seguir las instrucciones del Kit FPA para que los resultados no se vean afectados por los factores ya mencionados.

Con la información antes menciona se define la especificidad del “FPA” de 100% en muestras de animales vacunados con S19 a los 6,5 meses postvacuación, en donde resultados similares de especificidad fueron descritos por, Martinez, Torioni, Jacobo, & Cipolini, (2008) donde mencionan que el “FPA” posee una especificidad del 98,60 % , de igual forma, Cisterna, Conde, Hollender, Martino , & Samartino, (2015) también coinciden que la especificidad de esta prueba del “FPA” es de 99,8 % y 98,9 %.

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. CONCLUSIONES**

La vacuna S19 para brucelosis muestra una funcionalidad propia de una vacuna viva, proporcionando una inmunidad adecuada al animal en el tiempo.

La especificidad del “FPA” es de 100% a los 6.5 meses post vacunación con S19.

El tiempo óptimo post vacunación para el diagnóstico serológico con “FPA” de animales vacunados con S19 es de la semana 26 es decir 6,5 meses.

### **5.2. RECOMENDACIONES**

Vacunar a hembras bovinas en edad de 3-6 meses con la vacuna S19.

Muestrear animales a partir de la semana 26 post vacunación con S19 para el diagnóstico con la prueba “FPA”.

Ajustar el punto de corte del “FPA” para la situación epidemiológica donde se va a aplicar

En caso de no tener registros muestrear a hembras bovinas a partir de 1,5 – 2 años de edad.

Utilizar el “FPA” en combinación con otra prueba diagnóstica serológica en el esquema indicado a continuación:

**Tabla 4. Diagnóstico Serológico**

<b>Diagnóstico Serológico – Suero</b>	
<b>Diagnóstico Tamiz</b>	<b>Diagnóstico Confirmatorio</b>
RB	“FPA”
“FPA”	c-ELISA

**Elaborado por:** Autora



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M., & Ortiz, M. (2010). Prueba de anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de brucelosis bovina. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 4.
- AGROCALIDAD. (08 de 06 de 2008). *Programa Nacional de Control de Brucelosis*. Obtenido de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/pdf/sanidad-animal/02-control-zoosanitario/Resoluci%C3%B3n%20025.pdf>
- Agurto, & Fernández. (2013). *Prevalencia de Brucelosis bovina en la parroquia Ingapirca, cantón Cañar, provincia de Cañar*. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/415/1/tesis.pdf>
- Ancha, P., & Szyfres, B. (2001). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales tercera edición*. Obtenido de Volumen I. Bacteriosis y Micosis: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/165488/2/9275315809.pdf>
- 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.
- Cabrera, Silva, & Izquierdo . (2005). Empleo del Elisa DAVIH BRU 2 en el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 34.
- Castillo, A. (2012). *Prevalencia de brucella abortus en hembras bovinas mayores de 24 meses de edad*. Obtenido de [https://issuu.com/medicinaveterinariajdc/docs/prevalencia\\_de\\_brucella\\_abortus\\_en](https://issuu.com/medicinaveterinariajdc/docs/prevalencia_de_brucella_abortus_en)
- 
- Cisterna, C., Conde, S., Hollender, D., Martino , P., & Samartino, L. (2015). Diagnóstico serológico de brucelosis en caprinos: Comparación de técnicas. *SCIELO*, 8.
- Corbel, M. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization.
- Cuenca, M. D. (2012). *Prevalencia de brucelosis bovina en la parroquia Huertas del cantón Zaruma provincia del Oro*. Obtenido de Universidad Nacional de Loja: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5395/1/TESIS%20%E2%80%9CPREVALENCIA%20DE%20BRUCELOSIS.pdf>

- Díaz, Hernandez, Valero, & Arellano. (2000). Diagnostico de brucelosis animal.
- Giménez, Barcos, & Moran. (2007). Brucelosis: Técnica de fluorescencia polarizada, técnica para estar seguros. 5.
- Godfroid, Nielsen, & Saegerman. (2010). *Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718082>
- Gutiérrez, Lutzelschwab, Díaz, & Estein. (junio de 2014). *Fluorescence Polarization Assay for the Diagnosis of Anti-Brucella abortus Antibodies in Cattle Serum: Adaptation for its Use in Microplates and Comparison with Conventional Agglutination Tests*. Obtenido de Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis: <https://www.researchgate.net/publication/279290837>
- Ibarra, M., Benavides , H., Salgado, R., & Gutiérrez , M. (2013). *Determinación del punto de corte de la prueba de fluorescencia polarizada (FPA) para el diagnóstico de brucelosis bovina en Carchi – Ecuador*.
- Martínez Barreno, E. E. (09 de 2017). *Validación de la prueba de ELISA indirecto como herramienta de diagnóstico para el programa nacional de brucelosis bovina en el Ecuador*. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/26337/1/BQ%20136.pdf>
- Martinez, D., Torioni, S., Jacobo, R., & Cipolini, M. (2008). *Evaluación de las pruebas ELISA competitivo y Polarización fluorescente (FPA) para el diagnóstico de brucelosis en búfalos*. Obtenido de Secretaria General de Ciencia y Técnica: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2008/V-025.pdf>
- Meglia, G., Gastaldo, M., Álvarez , R., Oriani , S., Cerutti, D., Dubarry , J., . . . Perea, J. (2011). Influencia de la edad de vacunación con la vacuna B. abortus S19 en la respuesta serológica inducida en terneras. *SCIELO*, 8.
- Nielsen, K. (2010). *Serological diagnosis fo brucellosis* . Obtenido de <http://www.manu.edu.mk/prilozi/4kn.pdf>
- OIE. (2009). *Manua de diagnóstico serológico de brucelosis bovina* . Obtenido de <https://bpl2009.wikispaces.com/file/view/Manual+Brucelosis+SENASA+2009.pdf>
- Ortiz, Á. J. (01 de 09 de 2014). *Análisis de seropositividad de brucelosis bovina mediante ELISA competitiva y fluorescencia polarizada*. Obtenido de <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/90629.pdf>

- Ortiz, M., & Acosta, M. (2000). Prueba de Rosa de Bengala o Targeta en el Diagnóstico De Brucelosis. *SENASA*, 6.
- Pino, C. A. (2000). *Diagnóstico de brucelosis bovina mediante técnicas de unión primaria en leche y suero y la comparación con las técnicas tradicionales* . Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fvp657d/doc/fvp657d.pdf>
- Piñate, P. (30 de 09 de 2008). *Las vacunas contra la Brucelosis bovina*. Obtenido de <https://agronotas.wordpress.com/2008/09/30/brucelosis-bovina/>
- Pool et al, G. (2004). *Prevalencia de brucelosis bovinamediante ELISA competitivo en el municipio la Cañada de Urdaneta, Estado Zulia, Venezuela*. Obtenido de Prevalence of Bovine Brucellosis Using the Competitive ELISA Test in La Cañada de Urdaneta Municipality, Zulia State, Venezuela: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28090/2/art10.pdf>
- Pozo, M., & Noroña, G. (06 de 2011). *Determinación de brucelosis bovina (Brucella abortus) con la prueba de rosa de bengalaen la asociación “Union Libre” de la parroquia 10 de Agosto en la provincia de Pastaza*. Obtenido de Medicina veterinaria y zootecnia: <https://es.scribd.com/document/324947126/Determinacion-de-Brucelosis-Bovina-Brucella-Abortus-Con-La-Prueba-Rosa-de-Bengala-en-La-Asociacion-Union-Libre-de-La-Parroquia-10-de-Agosto-Provin>
- Ramires , C., Ernst, S., & Elvinger, F. (2009). *Respuesta serológica a la vacunación contra brucelosis en bovinos provenientes de un rebaño libre vacunados con dos dosis de vacuna Cepa RB-51*. Obtenido de Serological response to brucellosis vaccination in bovines from a free herd vaccinated with two doses of RB-51: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v41n2/art11.pdf>
- Ramírez et al, C. (2007). *Application of the Fluorescence Polarization Assay for Detection of Caprine Antibodies to Brucella melitensis in Areas of High Prevalence and Widespread Vaccination*. Obtenido de <http://cvi.asm.org/content/14/3/299.short>
- Rojas, C. (2005). *Caracterización de la respuesta inmune de bovinos frente ala vacunación con brucella abortus* . Obtenido de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130924/Caracterizaci%C3%B3n-de-la-respuesta-inmune-de-bovinos-frente-a-la-vacunaci%C3%B3n-con-Brucella-abortus-cepa-RB51.pdf?sequence=1>
- Ron, J. (2003). *Validacion de Técnicas Diagnosticas para la deteccion de Brucelosis y Estudio epidemiologico en una Region Andina del Ecuador*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/269929264\\_Validacion\\_de\\_tecnicas\\_diagnosticas\\_para\\_la\\_deteccion\\_de\\_brucelosis\\_y\\_estudio\\_epidemiologico\\_en\\_una\\_region\\_andina\\_del\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/269929264_Validacion_de_tecnicas_diagnosticas_para_la_deteccion_de_brucelosis_y_estudio_epidemiologico_en_una_region_andina_del_Ecuador)

- Ministerio de Agricultura Chile. (2013). *Instructivo técnico para el diagnóstico de brucelosis bovina mediante pruebas serológicas en laboratorios y equipos de muestreo en ferias ganaderas*. Obtenido de Chile: [https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/it\\_diagnostico\\_bb\\_pruebas\\_serologicas\\_d-gf-cgp-pt-021.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/it_diagnostico_bb_pruebas_serologicas_d-gf-cgp-pt-021.pdf)
- Samartino, L. (2006). *Conceptos Generales sobre brucelosis bovina*. Obtenido de [http://www.corfoga.org/new/images/public/documentos/pdf/brucelosis\\_bovina\\_esamartino.pdf](http://www.corfoga.org/new/images/public/documentos/pdf/brucelosis_bovina_esamartino.pdf)
- Samartino, Schust, Piazza, Salustio, & Conde. (2007). *Sitio Argentino de Producción Animal*. Obtenido de Diagnóstico de la brucelosis animal: Implementación de nuevas tecnologías: [http://www.produccionbovina.com/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/enfermedades\\_reproduccion/67-brucelosis.pdf](http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/67-brucelosis.pdf)
- Sánchez et al , A. (2011). *Desarrollo y evaluación de un protocolo serológico de fluorescencia polarizada en el estudio de anticuerpos contra Brucella spp en humanos*. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=372937683006>
- SENASA, & OIE. (2009). Laboratorio de referencia de la OIE para brucelosis coordinación general de laboratorio animal dirección de laboratorio y control técnico. En S. OIE, *Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina* (pág. 95).
- Solís Salas, T. V. (23 de 07 de 2008). *Departamento de ciencias de la vida carrera de ciencias agropecuarias – I.A.S.A. I “GRAL. Carlomagno Andrade Paredes”*. Obtenido de Cinética de anticuerpos en terneras inmunizadas contra Brucella, mediante la vacuna cepa 19 (B-19): <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2507/1/T-ESPE-IASA%20I-003803.pdf>
- Szyfres, B. (2015). *Brucelosis - Interpretación Del Diagnóstico Serológico*. Obtenido de <http://www.cdv.com.ar/wp-content/uploads/2015/07/brucelosis-bovina.pdf>
- The Center Food Security , & OIE. (2009). *Brucelosis*. Obtenido de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>
- Weiner , Iwuaniak, Slotnicka, & Szulowski. (23 de 07 de 2010). *Diagnosis of bovine brucellosis using traditional serological techniques and fluorescence polarization assay*. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/257251763>

## VII. ANEXOS

### Anexo 1.

#### Vacuna S19

BRUCELLA CEPA 19

Vacuna contra *Brucella abortus* Cepa 19.

USO EN:

Bovinos.

DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN:

Dosis: 2.0 ml.

Vía de administración: Subcutánea.

PRESENTACIÓN:

Frasco con 10 dosis (20.0 ml).



Recuperado de: <https://bit.ly/2JSJBMG>

**Figura 9:** Vacuna S19

**Fuente:** Recuperado de <https://bit.ly/2JSJBMG>

## Anexo 2.

### Kit FPA

BRUCELLA S ANTIBODY TEST KIT, FPA (Product Code B1001 • Package Insert 0515)

# BRUCELLA FPA

The **BRUCELLA S ANTIBODY TEST KIT, FPA** is a qualitative test using Fluorescence Polarization technology designed to determine the presence of antibodies in **serum, plasma, or milk samples**, against species of the genus *Brucella* which produce smooth colonies (*B. melitensis*, *B. abortus* and *B. suis* - Rev. sci. tech., OIE 1982). The presence of antibodies is indicative of prior infection with *Brucella*.

*Brucella* FPA has been validated for testing samples in **cattle, sheep, goats, swine, cervids, bison, buffalo, camels and other species as well**. Contact us for more details.

The diagnostic test uses an O-polysaccharide (OPS) extracted from *Brucella abortus* bacteria and conjugated with fluorescein. A fluorescence polarization instrument is used to measure the polarization state of the light emitted by the OPS conjugate (Tracer). When no antibodies are present, the polarization is low. Polarization increases when antibodies bind to the Tracer.

ELLIE • 10437 Innovation Dr., Wauwatosa, WI 53226, USA  
Phone/Fax: (800) 556-6953 • support@ellielab.com

ellie

Product Code B1001 • Package insert 0515

**BRUCELLA FPA**

BRUCELLA S ANTIBODY TEST KIT, FPA

ENGLISH

### Kit Contents

Kit size:	250 tests	1000 Tests
Positive Control	1 ml	1 ml
Negative Control	2 ml	2 ml
25X Sample Diluent	50 ml	50 ml
Tracer	2.5 ml	10 ml

### Materials Required But Not Provided

Other required materials not provided are: an FP instrument, 10x75 mm borosilicate glass test tubes for tube instruments, Sentry Microplate Strips or Sentry Deepwell Strips for strip readers, black microtiter plates for microplate instrument, pipettors and pipette tips and distilled or deionized water.

### Storage & Stability

Refrigerate 25X Sample Diluent at 2-8°C or store at room temperature. Store Tracer at 2-8°C. Controls that are frequently in use are stored at 2-8°C for up to six weeks. For longer term storage aliquot controls and store them at -20°C or lower. During use, avoid exposing Negative Control to temperatures higher than room temperature (up to 25°C). Kit is transported in a cooler at a temperature between 0 and 15°C.

### Warnings

Polarization readings are affected by temperature. **all reagents used in the test should be at the same temperature as samples tested**. Avoid temperature variations during the testing.

Avoid pipetting which creates bubbles. Use good quality calibrated pipettes. Avoid practices that may contaminate reagents.

All materials in this kit should be treated according to the MSDS. Avoid ingestion, eye contact, skin contact and other potential detrimental exposure. **All components contain less than 0.1% sodium azide.**

Do not use expired or contaminated components, or components from other kits. Do not mix components from different manufactured lots.

Instruments used to read test results must be obtained from or approved by Ellie. No warranty or performance is guaranteed otherwise.

### Preliminary Steps

Prepare **Sample Diluent** by mixing one part of 25X Sample Diluent with 24 parts of distilled or deionized water.

Check if the Sample Diluent is free of particulates. Heat up to 37°C to dissolve any crystals. Then bring to room temperature for use.

Samples must be free of particulates. Centrifuge all samples containing any visible particulates. Hemolyzed samples are acceptable for testing. Lyophilized samples should be reconstituted completely, and frozen samples fully thawed and mixed.

Clarify milk samples using **ClearMilk™** butter according to the enclosed procedure. Colostrum samples must be deproteinized before use.

### Testing Procedure

1. Pipette **20 µl** of samples and controls into tubes for Sentry tube instrument, strip wells for Sentry Strip Reader or wells of the microtiter plate for Sentry microplate instruments. Run Negative Controls in triplicate. Be careful to avoid bubbles when pipetting into the strips or microtiter plates.

**NOTE:** When testing in tubes or Sentry Strips, repeat controls after every 60 samples or 6 strips.

2. Pipette **1 ml** of the Sample Diluent into all tubes or wells of Sentry deepwell strips. Mix carefully.

Pipette **180 µl** of Sample Diluent into all microtiter stripwells or the microtiter plate. Mix carefully.

3. Incubate for **3-30 minutes** at room temperature.

4. Obtain **blank readings** of all samples and controls.

5. Add **10 µl** of Tracer into all tubes/wells containing controls and samples. Mix carefully.

6. Incubate for **3-5 minutes** at room temperature.

7. Obtain **mP readings** of all samples and controls.

### Test Validation

1. The Negative Control must read between 70 and 90 mP.
2. The Positive Control must read between 120 and 250 mP.
3. In case the Negative Control is outside of the range, adjust the instrument to read mean Negative Control at 80 ± 5 mP. For further instructions consult the instrument manual. Depending on the instrument, this can be done without retesting samples.
4. If the Negative Control is adjusted, and the Positive Control is outside of the range, test is considered invalid. Please contact technical support.

### Results & Interpretation

Calculate  $\Delta mP$  values for each sample by subtracting mean Negative Control mP from sample mP. Test results are interpreted according to the following table:

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

Negative	Suspect	Positive
≤ 10	10 - 20	> 20

Positive and suspect samples must be retested in duplicate. If both retests read equal or less than 10  $\Delta mP$  the sample is reported as Negative. If any of the retests is higher than 10  $\Delta mP$  the sample is reported as Positive.

Cutoff values may vary from country to country, for different use or vaccination status of animals.

### References

US Patent No. 5,976,820; 1999.

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, 2004.

EU Council Directive 64/432/EEC, 2008.

### Technical Support

We are always available to help:

ellie

Ellie LLC • 10437 Innovation Dr., Wauwatosa, WI 53226, USA  
Phone/Fax: (800) 556-6953 • support@ellielab.com

WARRANTY AND LIABILITY STATEMENT ON THE BACK PAGE

Figura 10: Kit FPA