

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

EVALUACIÓN DE ELISA INDIRECTA Y POLARIZACIÓN DE FLUORESCENCIA
COMO ALTERNATIVA DE “SCREENING” PARA BRUCELOSIS BOVINA

por

Daniela ROSAS *



TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene; inspección control
y tecnología de alimentos de origen
animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental



Montevideo
Uruguay
2011

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

ALVARO NUÑEZ 
nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor):

Andrés D. Gil 
nombre completo y firma

Tercer miembro:

JOSE PIAGGIO 
nombre completo y firma

Fecha:

23 / 12 / 2011

Autor:

DANIELA ROSAS 
nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a toda mi familia que me estuvo apoyándome a lo largo de toda mi carrera, de lejos y de cerca!

A mi tutor Andrés Gil.

A la Dra. Alejandra Suanes y Dr. Ricardo Zaffaroni por su apoyo y por haberme cedido su valioso tiempo y ayuda para la comprensión y realización de las pruebas.

A todos los compañeros de la Cátedra de Bioestadística que de alguna manera u otra estuvieron presentes y siempre dispuestos para evacuar cualquier duda.

A la DILAVE, por abrirme sus puertas y permitirme adiestrarme en la ejecución de las pruebas.

A Rosina de Biblioteca por su amabilidad y dedicación.

Y por último a todos mis amigos y amigas que a lo largo de toda la carrera fueron partícipes de algún modo.....

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
OBJETIVOS.....	21
HIPÓTESIS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Pruebas serológicas empleadas	
Rosa de Bengala.....	22
Rivanol.....	25
Polarización Fluorescente.....	26
ELISA Indirecto.....	30
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Prevalencia estimada expresada en porcentaje de la brucelosis bovina en el Uruguay.....	11
Tabla 2. Porcentaje de establecimientos estimados como positivos a la brucelosis bovina en el Uruguay.....	11
Tabla 3. Supervivencia de la Brucella en el medio ambiente.....	13
Tabla 4. Índices de rendimiento, desviación estándar y coeficiente de variación de las pruebas serológicas para la brucelosis bovina.....	20
Figura 1. Rotador utilizado en la prueba de aglutinación RB.....	23
Figura 2. Muestras de suero con reacciones positivas y negativas a RB.....	24
Figura 3. Diagrama de la realización del ensayo de FPA.....	29
Figura 4. Imagen del polarizador Diachemix.....	30
Figura 5. Curvas ROC según el solapamiento de las puntuaciones del test entre sanos y enfermos.....	32
Figura 6. Análisis de Curva ROC.....	33
Figura 7. Sensibilidad analítica.....	33
Figura 8. Sensibilidad analítica.....	34

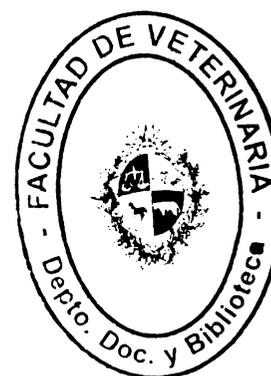
RESUMEN

La Brucelosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *Brucella abortus* que afecta principalmente a los bovinos y secundariamente a otras especies animales y a los humanos (fiebre ondulante). Normalmente, la enfermedad es asintomática en hembras no gestantes. En caso de infección por *B. abortus* las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que por lo general conduce al aborto entre el quinto y el noveno mes de gestación. Pocas enfermedades infecciosas disponen para su diagnóstico de tantas pruebas serológicas como la brucelosis bovina. En Uruguay se utiliza como prueba de screening Rosa de Bengala (RB) y como prueba confirmatoria Rivanol. Siendo estas técnicas junto a la Fijación del Complemento (FC) y a 2 Mercapto-etanol las únicas legalmente aceptadas en el país. Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar y validar las pruebas de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indirecta y Polarización Fluorescente (FPA) en suero como herramienta para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis bovina y su control-erradicación en el Uruguay, y 2) determinar la sensibilidad analítica de las pruebas de ELISA indirecta sobre pools de suero en busca de una alternativa para la vigilancia de rodeos a menores costos. Para ello se utilizó: 100 sueros negativos seleccionados de establecimientos ganaderos sin antecedentes históricos de *Brucella*, abortos infecciosos, y/o serología y 100 sueros positivos seleccionados del banco de sueros que se generaron a partir de focos activos de la enfermedad, a los cuales se les habían realizado las pruebas confirmatorias en la DiLaVe. Las pruebas serológicas utilizadas para analizar todas las muestras fueron: FPA, ELISA indirecto, RB y Rivanol. A los valores cuantitativos obtenidos se les realizaron curvas ROC (Receiver operating characteristic curve), los resultados obtenidos al comparar la eficacia de las pruebas de ELISA indirecto y de Polarización Fluorescente fueron de 0,9989 y 0,9990 respectivamente. Los resultados correspondientes a la sensibilidad analítica en diluciones no mayores a 1/8 fueron de un 94,44%. Se concluye que ninguna técnica diagnóstica es capaz de detectar el 100% de los animales infectados. Cada país debería adecuar las metodologías diagnósticas acorde a sus posibilidades y necesidades. Uruguay debería poner énfasis en mejorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la Brucelosis, debido a la baja prevalencia que se presenta en él actualmente. Las técnicas de ELISA indirecto y Polarización Fluorescente, utilizadas ampliamente a nivel internacional y recomendadas por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), tendrían que ser reevaluadas para implementarlas como alternativas más eficientes.

SUMMARY

Brucellosis is a bovine contagious infectious disease caused by *Brucella abortus* that primarily affects bovines, and secondarily other animal species and humans (undulating fever). The disease is usually asymptomatic in non-gestating females. If infected with *B. abortus* the gestating adult female develops placentitis that in general will result in abortion of the fetus between the 5th and 9th month of gestation.

Few infectious diseases have as many serologic diagnostic tests available as bovine brucellosis has. In Uruguay Rosa de Bengala (RB) is used as a screening test, and Rivanol as a confirmation test; together with Complement Fixation (FC) and 2 Mercapto-ethanol, these are the only techniques legally accepted in the country. The objectives of this study were: 1. To evaluate and validate indirect ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and Fluorescent Polarization Assay (FPA) tests as a bovine Brucellosis epidemiological surveillance tests and control-eradication in Uruguay. 2. To determine the analytical sensitivity of the ELISA test in an indirect serum pool to be used as a less costly alternative in herd surveillance. To this end we utilized: 100 serum negative samples selected from cattle herds without previous history of Brucella, infectious abortions, and/or serum positive cases; and 100 serum positive samples selected from a serum bank that collected samples after an active episode of the disease, and that had DiLaVe confirming tests done. The serum tests utilized to analyze all the samples were: FPA, ELISA indirect, RB and Rivanol. The quantitative values obtained were analyzed by the ROC (Receiver operating characteristic) curve, the results obtained when the efficacy of the ELISA indirect and Fluorescent Polarization tests were compared were of 0.99989 and 0.9990 respectively. The analytical sensitivity corresponding results for dilutions no greater than 1/8 were 94.44%. We conclude that no diagnostic technique is capable of detecting 100% of infected animals. Each country should adapt the diagnostic methods according to its possibilities and needs. Uruguay should place emphasis in better sensitivity and specificity of the techniques utilized for Brucellosis diagnosis, due to its actual low prevalence. The ELISA indirect and Fluorescent Polarization tests, widely used at international level and recommended by the World Animal Health Organization (OIE), should be evaluated to be implemented as more efficient alternatives.



INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de los animales que se trasmite al hombre, ocasionando una de las zoonosis más difundidas mundialmente. En los países de Latinoamérica se encuentra ampliamente distribuida, lo que constituye un severo problema no solo en lo referente a la salud pública y animal, sino también en el orden político, social y económico.

En los bovinos la brucelosis es causada por la *Brucella abortus*, provocando generalmente al contraer la infección aborto en el último tercio de la gestación, retención de placenta y descargas uterinas con la consiguiente eliminación masiva de brucelas por vía vaginal, lo que contribuye al contagio de otros animales que cohabitan en el rodeo. Hay hembras infectadas que se inmunizan con el curso de la enfermedad y no abortan. Las siguientes pariciones pueden ser normales pero la hembra infectada crónicamente debe ser eliminada.

El control de la enfermedad se basa principalmente en la vacunación como prevención, la vigilancia para detección de animales infectados, la separación inmediata de los animales positivos y su eliminación del rodeo con destino al sacrificio.

La brucelosis bovina ha sido diagnosticada por muchos años mediante diversas técnicas serológicas generalmente de aglutinación y o fijación de complemento, variando lo metodología según el país. La estrategia empleada es aplicar una metodología basada en una prueba tamiz “*screening*” con alta sensibilidad, donde los sueros positivos son analizados por pruebas complementarias que definen el estatus del animal.

En Uruguay se emplea la prueba de Rosa de Bengala (RB) como prueba tamiz, y Rivanol o Fijación de Complemento (FC) como pruebas confirmatorias. Esta metodología bien empleada ha contribuido por muchos años para el control y erradicación de la enfermedad. Sin embargo, las mismas presentan algunas dificultades que merecen ser mencionadas. Todas estas técnicas tienen el inconveniente de ser subjetivas y por ende depender de la capacidad de resolución del ojo del operador. Además, las mismas no tienen la capacidad de diferenciar los animales vacunados con cepa 19 de *Brucella abortus* de aquellos infectados por cepa de campo, lo cual en el caso de Uruguay no es importante dado que esta vacuna está prohibida desde 1996.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas con el objetivo de incrementar la calidad del diagnóstico y eliminar la subjetividad de las mismas. La aparición de los enzimo-inmunoensayos (ELISAs) contribuyó en gran medida a cumplir dichos objetivos. En primer término se desarrolló la ELISA indirecta (I-ELISA) con mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas convencionales y recientemente se desarrolló la técnica de Polarización Fluorescente (FPA) que no solo comparte las características de I-ELISA sino que es más simple y rápida. De este modo, se estima que la aplicación de estas nuevas técnicas podría contribuir en gran medida a los planes de control y erradicación de la brucelosis bovina.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las enfermedades importantes de los animales producidas por diversas especies de *Brucella* son causadas por *Br. abortus*, *Br. suis* y *Br. melitensis*, y sus hospedadores por orden de preferencia son bovinos, ovinos y caprinos. Si bien la *Brucella* posee amplio rango de hospedadores, no se transmiten fácilmente del hospedador preferido a otro, y si esto ocurre suelen localizarse en la glándula mamaria y el sistema retículo endotelial y no en el útero y membranas fetales.

La brucelosis está ampliamente distribuida y posee enorme importancia económica en casi todo el mundo, sobre todo entre el ganado lechero. La incidencia varía considerablemente según los rebaños, regiones y países. (Blood y Radostits 1992).

Haciendo una breve reseña de la enfermedad en nuestro país, la Brucelosis fue diagnosticada por primera vez en 1926 por el Dr. Cassamagnani en tambos de los departamentos de San José y Canelones y su constatación en humanos por Nin y Silva en 1931. Desde ese momento a la fecha esta enfermedad ha tenido diferentes etapas en su estrategia de control y erradicación. En el año 1964 se establece la vacunación obligatoria contra la enfermedad la que se continuó hasta 1996. Se debían vacunar todas las hembras bovinas entre los 3 y 6 meses de edad con la Cepa 19. Esta vacuna solo podía ser administrada por los Médicos Veterinarios habilitados por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) y cada animal vacunado debía ser identificado por medio de un tatuaje y una muesca en la oreja. A partir del año 1984 se agrega a la legislación el sacrificio sanitario de los animales que a las pruebas diagnósticas confirmatorias fueran positivos. En el año 1996 se suspendió la vacunación y en el año 1998 se establece la estrategia de erradicación y la declaración de predios oficialmente libres de la enfermedad que es la legislación vigente. En el año 2001 se comunicó la aparición de brotes de la enfermedad en el departamento de Rocha (César, D 2009). A partir de dos focos iniciales y mediante muestreos serológicos realizados sobre los linderos a ellos por la División Sanidad Animal, se detectaron 104 establecimientos positivos en ganadería de carne en el mencionado departamento. En el cual se aplicó la interdicción (cuarentena) con obligatoriedad del sangrado previo al movimiento de los ganados susceptibles en cinco seccionales policiales. De ese momento a la fecha con el incremento de la vigilancia se han ido diagnosticando focos en todos los departamentos del país. A mediados del 2003 también surgió una situación de preocupación en el departamento de San José, donde existía un número importante de focos (102) en establecimientos lecheros, lo cual se agravó durante el año 2005 al detectarse como positivo un campo de cría (Gil, A., Piaggio, J 2010). La estrategia de la campaña sanitaria se basa en el esquema prueba-sacrificio, acompañado de interdicción e investigación de los focos, perifocos, proveedores y compradores de animales al rodeo problema. En focos, perifocos y zonas problema se vacuna y revacuna a todas las hembras no preñadas mayores de cuatro meses, por parte de veterinarios privados habilitados (César, D 2009).

Las actividades de vigilancia en los establecimientos lecheros se realizan a través de la Prueba del Anillo en Leche (PAL) sobre las muestras de los tanques lecheros. Un PAL positivo lleva a la realización de serología en el establecimiento. Las actividades de vigilancia epidemiológica de los establecimientos que producen animales para carne, estuvieron basadas en muestreos en plantas de faena que se iniciaron recién

a fines del año 2002 (con una muestra de 18.997 sueros y en muestreos nacionales con 25.332 sueros aleatorios) y se mantienen hasta la fecha. En la cabaña nacional se monitorea mediante la exigencia de resultados serológicos negativos para el ingreso a las exposiciones, remates ferias, liquidaciones y exportaciones (Gil, A.; Piaggio, J 2010).

Desde 1997, en Uruguay se utiliza la vacunación con *Brucella abortus* RB51, ésta es una cepa rugosa, resistente a rifampicina, que ha sido derivada de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308. Es administrada en dosis que fluctúan entre 1×10^{10} y 4×10^{10} UFC por mililitro (Unidades Formadoras de Colonias) en bovinos mayores de 4 meses de edad. La protección que proporciona la vacunación con esta cepa se debe a la activación de linfocitos T.

La vacunación del ganado con RB51 permite la diferenciación entre bovinos vacunados y aquellos infectados con cepas silvestres, debido a que no induce anticuerpos contra la cadena O del lipopolisacárido de la *brucella abortus* (Rivers, R 2006), que es la responsable de la inducción de inmunoglobulinas detectables por las pruebas serológicas convencionales (Samartino, L., Salustio, E., Gregoret, R. 2003).

Se ha determinado que esta cepa puede causar placentitis, endometritis e infección fetal, en vaquillonas adultas que han sido vacunadas durante la preñez (Rivers, R 2006). Por esta razón Samartino (2003) recomienda aplicar la vacunación previa al servicio o en los primeros meses de la gestación (hasta el 4to mes de gestación) pues de este modo se puede alcanzar la inmunidad otorgada por la misma al llegar a la mitad de la gestación que es cuando al animal es altamente susceptible a la brucelosis. Según sus resultados la RB51 es segura, pues no produjo abortos, ni se eliminó por leche al aplicarse en hembras bovinas preñadas que hayan sido vacunadas previamente con la cepa 19. Desde el año 2002 la RB51 es la única vacuna permitida en el Uruguay (César, D 2009). Vacuna que se autorizó a través del decreto 432/2002 6/11/02.

El código zoosanitario de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) establece que un país o región libre de brucelosis será aquella que tenga menos de 0,2% de los rebaños con presencia de la enfermedad, que ningún animal haya sido vacunado en los últimos 3 años y que todo animal positivo haya sido sacrificado. En función de esta normativa una posible estrategia sería declarar al país libre a través de la declaración de rebaños oficialmente libres. El objetivo actual es bajar la prevalencia de la enfermedad de forma significativa, lo cual posibilitará que la gran mayoría de los establecimientos se libren de la enfermedad y por lo tanto de los riesgos y pérdidas que esto implica para la salud pública, el productor y la economía en general. (Gil, A., Piaggio, J 2010).

En las tablas 1 y 2 se observa la evolución de las prevalencias aparentes estimadas de los bovinos y rebaños según el rubro productivo entre 2002 y 2008

Tabla 1. Prevalencia estimada expresada en porcentaje de la brucelosis bovina en el Uruguay.

Bovinos	2002			2004			2006			2007			2008		
	Prev	EE	n												
Carne	0.24	0.14	18977	0.16	0.08	12621	0.23	0.21	11940	0.05	0.04	17205	0.30	0.14	20774
Leche	0.02	0.02	6355	0.42	0.26	6840	—	—	6609	0.04	0.04	9888	—	—	7168
Todos	0.22	0.13	25332	0.17	0.08	19461	0.22	0.20	18549	0.05	0.04	27091	0.26	0.12	27942

Nota: Prev = Prevalencia; EE = Error Estándar; n = tamaño de la muestra

Tabla 2. Porcentaje de establecimientos estimados como positivos a la brucelosis bovina en el Uruguay. (Datos 2004 preliminares).

Predios	2002			2004			2006			2007			2008		
	Prev	EE	n												
Carne	2.04	1.65	246	0.92	0.49	437	2.20	1.15	343	1.45	0.72	346	1.30	0.66	399
Leche	0.25	0.19	119	4.50	2.38	230	—	—	134	0.69	0.69	192	—	—	137
Todos	1.70	1.34	365	1.06	0.49	667	2.02	1.06	477	1.39	0.67	538	1.10	0.55	536

Nota: Prev = Prevalencia; EE = Error Estándar; n = tamaño de la muestra

A esta situación sanitaria, se agregó el incremento del diagnóstico de algunos casos de brucelosis en humanos de áreas rurales de zonas del departamento de Rocha, que determinaron, como está establecido, la transmisión de información entre los servicios locales y centrales del MGAP y el MSP para tomar las medidas que correspondían en forma coordinada. Estos casos pusieron sobre la mesa el riesgo que presupone esta zoonosis para los individuos que deben estar en contacto con los animales o sus productos (Gil, A., Piaggio, J 2010).

Desde el punto de vista de la salud humana, la brucelosis es importante, en virtud de que el microorganismo causal puede producir fiebre ondulante en el hombre. (Blood y Radostits 1992). La infección en humanos conduce a una enfermedad con tendencia a la cronicidad, con fiebre y malestar recurrentes que deterioran su calidad de vida y que además puede presentar complicaciones como artritis y meningitis entre otras (Rivers, R 2006).

La posibilidad de que la infección ocurra por ingestión de leche infectada impone la necesidad de pasteurizar este alimento. Los métodos oficiales aprobados de pasteurización comercial convierten la leche cruda, contaminada por *Brucella* de forma natural, en apta para el consumo. Sin embargo la mayoría de los casos de infección en el hombre es de tipo profesional y se observa en granjeros, veterinarios y carniceros. El microorganismo puede aislarse de muchos órganos, además de las ubres y el útero y es grave motivo de exposición el hecho de manipular abortos y

membranas fetales de animales infectados. La importancia de la enfermedad en el hombre justifica ampliamente la erradicación de este padecimiento. Casi todos los casos ocurren en personas empleadas en la industria de la carne, mientras otras fuentes incluyen porcinos, bovinos y productos lácteos no pasteurizados. (Blood y Radostits 1992).

La prevención de la enfermedad se puede realizar mediante el empleo de guantes al realizar tactos, a la manipulación de fetos y de lesiones mamarias; quemar restos de fetos y placentas; empleo de desinfectantes como amonio cuaternario y alcohol 70°; manipulación correcta de jeringas y frascos de vacunas contra la brucelosis, y en determinadas circunstancias el uso de anteojos protectores (Samartino, L. 2003).

Las pérdidas de productividad causadas por este mal pueden tener gran importancia, principalmente, debido a descenso en la producción de la leche a causa de los abortos de las vacas. La infertilidad como secuela, frecuentemente, aumenta el período entre las lactancias, y en un rebaño infectado el promedio entre los partos puede prolongarse durante varios meses. Además de la pérdida de producción de leche, existen también pérdidas de terneros e interferencias con los planes de crianza. Posee esto gran importancia en los rebaños destinados a producción de carne, donde los terneros representan la única fuente de ingresos. La frecuencia elevada de infertilidad permanente y pasajera provoca el sacrificio de muchas vacas valiosas y algunas muertes, como consecuencia de metritis aguda seguida de retención de placenta (Blood y Radostits 1992).

Se han estimado las pérdidas para toda Sudamérica en 270 millones de dólares al año. De estas pérdidas, el 47 % corresponden a pérdidas en la producción de crías, 41% en producción de leche y 12% en costos de reposición de vientres. (Maldonado, J. y col. 2010).

La infección afecta a bovinos de todas las edades, pero persiste con mayor frecuencia, en animales sexualmente adultos, si es congénita puede también afectar a terneros nacidos de hembras enfermas. La infección ocurre en el útero y puede permanecer latente en el ternero durante toda la vida. El animal da pruebas serológicas negativas hasta su primer parto, momento en el cual comienza a excretar el microorganismo. Los terneros nacidos de hembras reactivas suelen ser serológicamente positivos durante 4 a 6 meses debido a los anticuerpos calostrales, y después suelen convertirse a serológicamente negativos, aun cuando pueda haber una infección latente en una pequeña proporción de estos animales. Estas infecciones latentes en los animales serológicamente negativos son de gran importancia porque pueden permanecer inadvertidos y finalmente actuar como fuente de infección.

Se observa la concentración más elevada de *Br. abortus* en el contenido del útero gestante, en el feto y en las membranas fetales, estructuras que deben considerarse fuentes importantes de infección (Blood y Radostits 1992). En el ganado bovino la bacteria se ubica en la placenta y órganos reproductores por su afinidad por el eritritol (Rivers, R 2006).

La enfermedad se trasmite por ingestión, penetración a través de la conjuntiva y piel indemne y contaminación de la ubre durante el ordeño. El pastoreo en áreas

infectadas o el consumo de otros materiales alimenticios y agua contaminada, con secreciones y membranas fetales de vacas infectadas, y el contacto con fetos abortados y neonatos infectados se consideran las formas más frecuentes de propagación. Ésta dentro de un rebaño ocurre por transmisión, tanto vertical como horizontal. También existe infección congénita provocada por la infección dentro del útero pero su importancia no se ha esclarecido totalmente. La transmisión horizontal suele ocurrir por contaminación directa, y aunque las posibilidades de infección por moscas, perros, garrapatas, calzados, trajes y otros objetos inanimados infectados existen, no se considera de mayor importancia en cuanto se refiere a las medidas de control.

El microorganismo puede sobrevivir en los pastos durante períodos variables según las condiciones del medio. En climas templados, la capacidad infecciosa puede persistir durante 100 días en invierno y 30 en verano. El microorganismo es susceptible al calor, luz solar y desinfectantes estándar, pero la refrigeración permite la supervivencia casi indefinida. La actividad de varios desinfectantes contra *Br. abortus* se ha estudiado, y representantes de los fenoles, halógenos, amonios cuaternarios y desinfectantes con grupos aldehídos a concentraciones del 0.5 ó 1 por 100 en ausencia de suero, generalmente, inhibían una concentración elevada del microorganismo.

Tabla 3. Supervivencia de la Brucella en el medio ambiente.

<i>Material</i>	<i>tiempo de supervivencia</i>
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días.

Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39 (2): 203-16

La cola de las vacas muy contaminada con secreciones uterinas infectadas puede diseminar la infección si se pone en contacto con la conjuntiva o piel indemne de otros animales. Así como la mayor parte de las formas de mastitis puede propagarse durante el ordeño la infección por *Br. abortus* puede diseminarse a partir de una vaca cuya leche contiene el microorganismo, si se pone en contacto con una vaca no infectada. Quizá este mecanismo tenga poca importancia en términos de producción de abortos, pero si puede poseerla en cuanto se refiere a sus efectos sobre pruebas de aglutinación en la leche y presencia de microorganismos en este líquido utilizado para el consumo del hombre.

Los toros no suelen transmitir la infección de una vaca infectada a una sana mecánicamente. La menor probabilidad de transmitir la infección la tienen aquellos que están infectados y secretan semen que contienen microorganismos, pero la probabilidad de propagación a partir del toro es muy grande si se emplea el semen para inseminación artificial debido a que el mismo es depositado en forma intrauterina.

La excreción del microorganismo en la leche suele ser intermitente, pero se observa más a menudo durante la lactancia tardía y puede continuar durante varios años. Según Samartino (2003) otras vías de eliminación podrían ser la orina y materias fecales.

La primera causa de infección de un establecimiento ocurre fundamentalmente por introducir animales infectados procedentes de establecimientos con estatus desconocido para esta afección. Puede ocurrir también que animales de un establecimiento se trasladen a otros campos para recría, engorde y vuelvan infectados al entrar en contacto con animales portadores. De este modo es altamente recomendable conocer la procedencia de los animales y el estado sanitario del rodeo del cual provienen. Por supuesto debe hacerse una sangría en el lugar de compra y descartar los animales en caso de encontrarse positivos. Es muy importante al detectar animales positivos en los animales de compra NO adquirir ningún integrante del lote, pues es frecuente el rechazo de los positivos y la compra de los restantes. Esto es debido a que, existe la alta probabilidad de que haya animales en fase de incubación que no fueron detectados todavía. Además, es recomendable realizar una cuarentena en el establecimiento comprador antes de juntar los animales adquiridos con los del propio establecimiento. De manera alternativa también contribuyen los perros, zorros, u otros animales carnívoros que llevan restos de fetos abortados, placentas u otros animales infectados de un establecimiento a otro vecino (Samartino, L. 2003).

Otro error en los programas de Brucelosis, fue el no reconocer la importancia de vaquillonas expuestas al agente en el rodeo. Es la categoría más susceptibles a la enfermedad, ya que con pequeñas dosis de bacterias se hacen portadoras. Otro problema en esta categoría es que aunque estén infectadas suelen ser negativas a los análisis hasta que están a punto de parir. Hay que hacer un manejo especial con las vaquillonas porque sino continúan infectando al rodeo. Hay 3 medidas que se pueden tomar con las vaquillonas de predios que son foco:

- La más difícil pero la más importante es eliminar la vaquillona que ha sido expuesta. Desde el punto de vista de la enfermedad es la mejor medida, pero la mayoría de los productores se oponen.

- Si el productor no quiere deshacerse de las vaquillonas, lo mejor es separarlas del rodeo porque diseminan la enfermedad cuando abortan o cuando paren. Se deben separar las vaquillonas antes de los 7 meses de gestación y mantenerlas así hasta después que termine la parición donde se debe realizar una serología de todas ellas.
- El manejo menos deseable es mantener las vaquillonas con el resto del rodeo. Luego de la parición se puede hacer la serología de todo el rodeo. Usualmente es la manera más lenta de sanear un rodeo así, lleva años (César, D 2009)

El signo predominante en hembras preñadas es el aborto, o bien el nacimiento de prematuro o a término de terneros débiles. Generalmente el aborto se produce en la segunda mitad de la preñez, a veces con retención placentaria, cuya consecuencia puede ser la metritis y la infertilidad. Las hembras no preñadas no muestran síntomas clínicos y cuando se infectan antes del servicio muchas veces no abortan. El periodo de incubación es muy variable y se relaciona con el estado fisiológico del animal; puede variar desde 10 a 15 días hasta varios meses, es corto en animales preñados. La bacteriemia es importante en el hombre y en el perro (Samartino, L.2003)

Las hembras son más infecciosas y liberan enormes concentraciones de brucelas en la parición, aborto y parto prematuro y por vía mamaria (Casas R. 2008). La eliminación de brucelas por vía vaginal puede comenzar una semana antes del parto/aborto hasta 45/60 días posteriores al mismo. La cantidad de brucelas excretadas es variable y puede alcanzar hasta 1×10^{14} /gramo de placenta (rumiantes) (Samartino, L.2003)

En el toro las brucellas pueden localizarse en los testículos y glándulas genitales anexas. Cuando la infección se manifiesta clínicamente, se puede encontrar uno o ambos testículos aumentados de tamaño, con disminución de la libido e infertilidad. A veces puede haber atrofia del testículo debido a adherencias y fibrosis. Es frecuente la vesiculitis y ampulitis. Ocasionalmente se pueden observar en los bovinos higromas y artritis (Walsh I. 1996)

La transmisión por inhalación aerógena es posible cuando en establos, galpones y espacios cerrados, cohabitan animales susceptibles con animales infectados que pueden liberar aerosoles con altas concentraciones de bacterias (Casas R. 2008)

Todos los abortos en el ganado bovino deben de considerarse como casos sospechosos de brucelosis y deberían investigarse. El cuadro clínico no es patognomónico, aunque la historia del rebaño puede servir de ayuda. El diagnóstico inequívoco de infecciones por *Brucella* solo puede hacerse por aislamiento e identificación de *Brucella* pero en situaciones en la que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede basarse en métodos serológicos. No existe una prueba única que permita la identificación de *Brucella*. Normalmente se necesita una combinación de las características de crecimiento y métodos serológicos y bacteriológicos (OIE. 2004).

Los métodos de diagnóstico directo se realiza a través de la obtención de muestras del animal, ya sean: ganglios o flujos uterinos y vaginales, placenta y cotiledones, fetos, leche, semen, sangre; los cuales posibilitan el diagnóstico bacteriológico directo con el cultivo, aislamiento y caracterización de *Brucella abortus*, siendo

concluyentes demostración de infección. (Cuando se practica la vacunación en hembras adultas es necesario diferenciar si el aislamiento es de una cepa virulenta o de la cepa de vacuna ya que un porcentaje muy bajo de hembras vacunadas podría alojar en la ubre la cepa atenuada de vacuna).

Un examen bacteriológico negativo no ofrece garantía que el animal está libre de infección. El examen bacteriológico lleva tiempo, es costoso y de baja sensibilidad.

El diagnóstico directo debe ser usado, toda vez que sea posible y necesario, para confirmar la infección humana o animal y para descubrir casos con infección crónica (Casas Olascoaga, R. 2008).

Cuando se pretende aislar brucelas, nunca se adicionarán antibióticos y/o bacteriostáticos a los materiales recogidos, los cuales se remitirán rápidamente al laboratorio, refrigerados y/o congelados (Samartino, L.2003). El aislamiento de *B. abortus* debe llevarse a cabo en medios selectivos y enriquecidos, aunque *B. abortus* crece bien en medios como Agar sangre, los contaminantes presentes en la muestra pueden crecer más rápidamente y enmascarar la presencia de aquella. El medio de elección utilizado en la DI.LA.VE es Agar-triptosa suero con adición de antibióticos (Navarro, F. 1995)

Las muestras recibidas en el laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad tienen básicamente dos procedencias:

1-Fetos remitidos por médicos veterinarios (participación activa en la vigilancia epidemiológica). Es de resaltar la importancia que tiene el recibir junto con el feto, el suero de la madre, ya que a veces el aislamiento resulta fallido y por medio de la serología se tiene una aproximación al diagnóstico. Esto ya ha sucedido en la DILAVE y por esta vía se han identificado predios con brucelosis.

2-Materiales remitidos por industria animal, provenientes de animales reaccionantes a las pruebas serológicas enviados a frigorífico y que se deben confirmar por aislamiento. Las muestras de elección en este caso son útero (gestado o no) ganglios retromamarios, iliacos y mesentéricos (D'Anatro, N. 2003).

Las brucelas ven favorecida su crecimiento intracelular en los trofoblastos por la presencia del eritrol, un alcohol de 4 carbonos, que es un componente normal de los fluidos fetales bovinos. Otros azúcares simples como la glucosa, manosa, galactosa, fructosa, y N-acetil glucosamina no estimulan el crecimiento de estas bacterias en los tejidos fetales.

Hay cepas que requieren CO₂ suplementario para su crecimiento. La temperatura óptima para esta actividad es de 37°C; la mayoría de las cepas pierde su viabilidad a los 56°C; su esterilización se produce a una temperatura mayor a los 80°C. Para su crecimiento requiere pH de 6,6 a 7,4 siendo destruidas a un pH menor a 3,5 (Navarro, F. 1995)

La bacteria es de lento crecimiento y normalmente las colonias características se ven después de 3-5 días de incubación en microaerófila (10% de CO₂). En el primo-aislamiento las colonias son usualmente lisas, de apariencia opaca y de un diámetro de 2-3 mm (D'Anatro, N. 2003). *B. abortus* es una bacteria Gram negativa con un lipopolisacárido (LPS) fuertemente inmunodominante, el que junto con la capacidad

de sobrevivir en el interior de células fagocíticas constituyen sus principales factores de virulencia (Rivers, R 2006).

Tradicionalmente la identificación de *B. abortus* se lleva a cabo con unas pocas pruebas bioquímicas, que junto a la apariencia de las colonias y test de coloración de la bacteria servían para determinar que el aislamiento se correspondía con *B. abortus*. Las pruebas bioquímicas usadas para la tipificación son: test de catalasa, test de oxidasa, producción de sulfhídrico, rápida actividad de la ureasa, test de indol y crecimiento en medios con inclusión de colorantes. Este tipo de identificación dejaba ciertos interrogantes en la diferenciación con cepas vacinales (*B. abortus* cepa 19) que aunque no es usual puede ocurrir su aislamiento y era necesario diferenciarla, para ello se requerían pruebas bioquímicas adicionales como la inclusión de eritritol en el medio lo que traía aparejado una demora más en el diagnóstico.

Es necesario aclarar que toda esta adición de pruebas, implica más riesgo para el operario ya que en todo momento se trabaja con un patógeno viable, causante de una importante zoonosis.

DI.LA.VE. ha incorporado a sus técnicas de diagnóstico la prueba de "Reacción de la polimerasa en cadena" (comúnmente conocida como PCR). Esta prueba ha sido particularmente útil en el caso de *B. abortus* ya que permite una identificación precisa del agente involucrado, o sea determinar si es *B. abortus*, así como su diferenciación con *B. abortus* cepa 19. Por otro lado se gana en bioseguridad ya que se trabaja con bacterias inactivas, dado que la identificación se hace a punto de partida del genoma bacteriano por lo tanto no importa si las bacterias están vivas o no (D'Anatro, N. 2003). Las técnicas de bioingeniería como la Reacción en cadena de polimerasa (PCR) permiten un diagnóstico rápido pero no siempre están accesibles o disponibles (Casas Olascoaga, R. 2008).

La aplicación de los métodos de diagnóstico indirecto se realiza a través de pruebas con suero sanguíneo, leche, crema y líquido seminal efectuadas con reactivos padronizados dando evidencias indirectas de la infección.

Hay un buen número de pruebas indirectas, presuntivas y de pruebas diagnósticas confirmatorias, pero ninguna es 100% efectiva en todas las fases de la evolución de la infección que caracterizan la brucelosis. Las pruebas individuales no siempre predicen el verdadero estado del animal en relación a la infección/enfermedad. La combinación de las pruebas y la repetición de los exámenes hacen posible que con exactitud pueda lograrse el diagnóstico en la "unidad epidemiológica del rodeo o rebaño".

En el diagnóstico se requiere responsabilidad y eficacia ya que basado en los resultados de las pruebas indirectas es que se adoptan y aplican las decisiones sobre sacrificio sanitario, interdicción/cuarentena, despoblación, vacunación, las cuales son trascendentes para el futuro productivo y económico del establecimiento afectado (Casas Olascoaga, R. 2008)

Para comprender la necesidad de utilizar una técnica u otra, debemos considerar dos elementos muy conocidos, pero frecuentemente no recordados: la sensibilidad y especificidad de las mismas. Entendemos por sensibilidad de una prueba, el grado de capacidad que tiene para detectar animales infectados por el agente etiológico

específico, en nuestro caso, por *Brucella abortus*. De esta manera, si la prueba que usamos da reacciones positivas en 98 animales de 100 bovinos infectados, decimos que la prueba tiene 98% de sensibilidad. El 2% restante son “falsos negativos”. En un programa de erradicación interesa mucho que la prueba empleada sea lo suficientemente sensible para que el grado de error por “falsos negativos” sea el menor posible, ya que el objetivo es eliminar todo foco de infección de un rodeo (Samartino, L. 2007)

En Uruguay no se ha realizado un trabajo sistemático de validación de las pruebas oficiales a nivel nacional y se utilizan estimaciones de sensibilidad y especificidad tomadas de la literatura. Es así que se asume que la prueba de rosa de bengala RB tiene una sensibilidad de 95,2% y una especificidad de 98,5%, pero por otro lado no se desconoce que hay reportes en la literatura de sensibilidades mucho más bajas estimadas con animales con aislamientos positivos. Una reciente revisión de la literatura reporta los siguientes valores medios para las técnicas que se utilizan en el país Rosa de Bengala sensibilidad 81,2% y especificidad 86,3%, Rivanol sensibilidad 89,6% y especificidad 63,1%. Prueba de anillo en leche tanque PAL sensibilidad 89,5% y especificidad 74,5%. En otra revisión se expresa que el rango de variaciones de RB para sensibilidad va de 21,0% a 98,3% y para especificidad de 68,8% a 100% y en Rivanol la variación es de 50,5% a 100% en sensibilidad y 21,9 a 100% en especificidad (Gil, A., Piaggio, J 2010).

La sensibilidad de una prueba se puede expresar en la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos (infectados)}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

Ninguna prueba es capaz de descubrir el 100% de bovinos infectados en todos los rodeos.

Por especificidad, en cambio, medimos el grado de capacidad de la prueba en detectar el mayor número de no infecciones (verdaderos negativos) y por lo tanto el menor número de “falsos positivos”. Una prueba altamente específica será la que dé menos reacciones de “falsos positivos”. Si de 100 animales no infectados la prueba da reacciones positivas en cinco animales, decimos que la misma tiene una especificidad del 95%. Una prueba poco específica es causa, por consiguiente, del sacrificio de animales sanos y de pérdidas económicas innecesarias. Ninguna prueba serológica, sin embargo, es 100% específica.

La especificidad se puede expresar en la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos (no infectados)}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Si nosotros quisiéramos dar a una prueba mayor sensibilidad, disminuiría a la vez la especificidad. Por ejemplo, si aumentáramos la densidad del antígeno para la prueba de seroaglutinación, aumentaríamos la sensibilidad, pero a la vez reduciríamos la especificidad.

La eficacia de una prueba diagnóstica depende de su sensibilidad y especificidad, valores que miden la proporción de “falsos negativos” y de “falsos positivos” respectivamente. La importancia de estos criterios puede ir cambiando a medida que se reduce la prevalencia de la infección (Samartino, L. 2007).

Los **valores predictivos** (positivo y negativo) miden la eficacia real de una prueba diagnóstica. Son probabilidades del resultado, es decir, dan la probabilidad de padecer o no una enfermedad una vez conocido el resultado de la prueba diagnóstica. Se trata de valores post-test y dependen de la prevalencia de una enfermedad, es decir, del porcentaje de una población que está afectada por esa determinada patología, en nuestro caso Brucelosis.

Los valores predictivos (positivo y negativo) son índices que evalúan el comportamiento de la prueba diagnóstica en una población con una determinada proporción de enfermos por lo que sirven para medir la relevancia de la sensibilidad y especificidad en una determinada población (Altman DG, Bland JM).

Cuando se trata de animales sanos, la mayoría no poseerá Ac detectables, sin embargo algunos de estos verdaderos negativos pueden tener bajos títulos de Ac, inducidos posiblemente por Ag que comparten epítopes con *Brucella abortus*, por Ac residuales de vacunación o por Ac inespecíficos. En consecuencia se podrán producir resultados falsos positivos.

En el caso de animales enfermos el título de Ac puede ser elevado, aunque como su distribución en la población es normal, algunos verdaderos positivos también poseerán títulos bajos. Tal es la situación de animales que se encuentran incubando la enfermedad (es decir desde la exposición a la infección hasta la aparición de las aglutininas), vacas recién paridas en las que los anticuerpos son eliminados por la leche, en estos casos se podrán obtener resultados falsos negativos (Pennimpede, E.F.F., Di Lorenzo, C.L 1990).

D. Gall y K. Nielsen (2004) reportan que, al comparar el rendimiento y el costo de las pruebas de diagnóstico serológico de brucelosis mediante la sumatoria de los valores de sensibilidad y especificidad de cada prueba, se calculan las medidas para obtener un índice de rendimiento (IR) permitiendo la comparación de los distintos métodos. Una puntuación de 200 equivaldría a la perfección. Atendiendo al IR, la prueba de aglutinación en placa del antígeno tamponado fue, de entre las pruebas convencionales, la que arrojó una puntuación más alta (IR=193,1), lo que pone de manifiesto su mayor exactitud en comparación con otras pruebas de esta clase, como la de Rosa de Bengala (IR=167,6) o la de fijación de complemento (IR=172,5). En conjunto, los ensayos de fijación primaria, en particular el de fluorescencia polarizada (IR=196,4), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto (IR= 189,8) y el ELISA de competición (IR=188,2), ofrecían más exactitud que las pruebas convencionales exceptuando la de aglutinación en placa del antígeno tamponado. Por otro lado, de la comparación de los precios de las pruebas se desprende que las de fijación primaria pueden competir en este terreno con las pruebas convencionales de diagnóstico de la brucelosis y que por lo tanto ofrecen una mejor relación entre costo y eficacia. Cuando hablamos de costo nos referimos a la pérdida que conlleva un diagnóstico erróneo.

Test	Total number of samples tested	Mean of sensitivities	Mean of specificities	Mean PI	SD	% CV
Particle concentration fluorescence immunoassay (n = 6)	2,436	91.8	46.7	138.5	21.6	15.6
Culture (n = 1)	102	46.1	100.0	146.1	N/A	N/A
Card (n = 11)	6,434	91.0	55.2	146.2	31.3	21.4
Rivanol test (RIV) (n = 12)	4,845	89.6	63.1	152.7	25.3	16.6
Milk ring test (n = 6)	7,328	89.5	74.5	164.0	22.2	13.6
Indirect haemolysis test (n = 3)	970	91.0	75.4	166.4	40.9	24.6
Rose Bengal test (n = 11)	12,146	81.2	86.3	167.6	24.8	14.8
Tube agglutination test (n = 14)	9,534	75.9	95.7	171.6	20.1	11.7
Complement fixation test (n = 38)	28,537	89.0	83.5	172.5	24.3	14.1
Plate agglutination test (n = 4)	2,754	77.1	96.0	173.1	8.5	4.9
Milk complement fixation test (n = 1)	2,147	89.0	86.0	175.0	N/A	N/A
Allergic skin test (n = 3)	3,811	78.3	99.7	178.0	14.8	8.3
Haemolysis-in-gel test (n = 3)	2,450	80.1	99.3	179.4	27.2	15.2
2-mercaptoethanol test (n = 4)	7,693	88.4	91.5	179.9	21.3	11.8
Polymerase chain reaction (n = 5)	539	82.0	98.6	180.6	21.4	11.9
Radial immunodiffusion (RID) (n = 2)	1,525	90.6	90.0	180.6	18.2	10.1
Fluorescence immunoassay (n = 3)	690	88.1	94.6	182.7	16.9	9.3
Agar gel immunodiffusion test (n = 1)	156	87.5	100.0	187.5	N/A	N/A
Milk fluorescence polarisation assay (n = 3)	5,580	88.8	99.2	188.0	11.2	6.0
Competitive enzyme-linked immunosorbent assay (n = 14)	15,865	97.7	90.5	188.2	16.6	8.8
Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (n = 37)	60,905	96.0	93.8	189.8	18.1	9.5
Buffered antigen plate agglutination test (n = 15)	60,634	95.4	97.7	193.1	6.3	3.3
Milk indirect enzyme-linked immunosorbent assay (n = 7)	16,921	97.9	96.1	194.0	5.6	2.9
Blood fluorescence polarisation assay (n = 2)	1,385	97.2	98.4	195.6	4.3	2.2
Bulk milk tank fluorescence polarisation assay (n = 1)	258	100.0	95.9	195.9	N/A	N/A
Fluorescence polarisation assay (n = 7)	38,994	97.5	98.9	196.4	4.4	2.2

Tabla 4. Índices de rendimiento, desviación estándar y coeficiente de variación de las pruebas serológicas para la brucelosis bovina (Gall, D., Nielsen, K 2004).

OBJETIVOS



General:

Evaluación y validación de las pruebas de ELISA Indirecto y polarización fluorescente, como herramientas para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis bovina a nivel individual o de rodeo en Uruguay.

Específicos:

Evaluar y validar el ensayo de Polarización Fluorescente en suero, como herramientas para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis bovina y su control-erradicación en el Uruguay.

Determinar, la sensibilidad analítica de las pruebas de ELISA indirecta sobre pools de suero en busca de una alternativa para la vigilancia de rodeos a menores costos.

HIPÓTESIS

Polarización Fluorescente es una herramienta válida para la vigilancia epidemiológica de Brucelosis bovina en Uruguay.

Sobre pools de sueros, la prueba serológica ELISA Indirecto permite la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis en rodeos a menores costos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron en el laboratorio instalado en el Área de Bioestadística 700 sueros. En su totalidad fueron evaluados por la DILAVE a través de los métodos convencionales de Rosa de Bengala y Rivanol, clasificándose en esta instancia como positivos y negativos.

Posteriormente de esos 700 sueros se seleccionaron 200, teniendo en cuenta la cantidad y la calidad de las muestras. Los 100 sueros negativos procedían de establecimientos ganaderos sin antecedentes históricos de *Brucella abortus*, abortos infecciosos, y/o serología positiva. Los 100 sueros positivos fueron seleccionados del banco de sueros, generados a partir de focos activos de la enfermedad y se le realizaron pruebas confirmatorias en la DILAVE.

Todas las muestras fueron analizadas por las pruebas de Polarización Fluorescente, Rosa de Bengala y Rivanol. Para la determinación de la sensibilidad analítica a través de la técnica de ELISA Indirecto, se realizaron diluciones seriadas (formación de pooles) con la utilización de sueros positivos y negativos.

Con el objetivo de alcanzar un resultado más confiable, disminuyendo errores en la manipulación y realización de las técnicas, se llevó a cabo un entrenamiento en la DILAVE sobre las técnicas convencionales de diagnóstico de *Brucelosis* (Rosa de Bengala y Rivanol), y en la Cátedra de Bioestadística sobre las nuevas técnicas (ELISA indirecta y Polarización Fluorescente).

Pruebas Serológicas empleadas

➔ *Prueba del Rosa de Bengala (Tarjeta o Card Test)*

Dentro de la reglamentación vigente en nuestro país se utiliza como pruebas primarias la Prueba de Anillo en leche (PAL) y la Prueba de Rosa de Bengala (RB).

La prueba de RB se realiza sobre muestras individuales de suero, muestras identificadas y que corresponden a un animal determinado dando por lo tanto la identificación del reaccionante. Consiste en una aglutinación en una placa del antígeno tamponado y los anticuerpos en el suero. Esta prueba era originariamente realizada solamente en los laboratorios oficiales pero debido al gran volumen de muestras se recurrió a la habilitación de laboratorios privados que realicen esta prueba primaria para el programa oficial de control de brucelosis bovina (Lyford Pike, V., 2003).

Actualmente en Uruguay existen más de cien laboratorios habilitados por la DILAVE para la realización de esta prueba tamiz.

La Prueba RB es una prueba sencilla de aglutinación puntual que utiliza antígeno coloreado con rosa de bengala y tamponado a bajo pH, normalmente $3,65 \pm 0,05$.

El antígeno RB utilizado en este estudio fue producido y adquirido en la DILAVE. Las placas blancas de acrílico para la mezcla del suero y del antígeno se confeccionaron acorde a las medidas del rotador utilizado.

El antígeno debe mantenerse en refrigeración a una temperatura de 4 a 8° C. Se debe evitar su congelación, porque queda inutilizado para la prueba.

Previo a la realización de la prueba tanto el antígeno RB como las muestras del suero deben ser llevadas a temperatura ambiente como mínimo una hora antes.

En líneas generales la prueba se realiza en la forma siguiente:

- a) Colocar una gota (0,03 ml) de plasma o suero problema sobre una de las placas de acrílico.
- b) Colocar una gota (0,03 ml) de antígeno RB - agitándola previo a la extracción- cerca de la gota de suero.
- c) Mezclar bien el suero y el antígeno utilizando un agitador o mondadientes distinto para cada muestra. La superficie ocupada por la muestra debe tener un diámetro de 23 a 24 mm.
- d) Hacer agitar suavemente la placa en el rotador, durante cuatro minutos a razón de 10 a 12 movimientos por minuto.
- e) El resultado de la prueba se lee finalizado el período de cuatro minutos. Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños.



Figura 1. Rotador utilizado en la prueba de aglutinación RB. Daniela Rosas.

La prueba RB es cualitativa, por lo que el resultado se informa como positivo o negativo (García-Carrillo, C., 1982)

En animales que nunca fueron vacunados con cepa 19, la reacción positiva es un indicador de infección muy probable.

La prueba de RB es sensible. Sin embargo pueden existir reacciones serológicas positivas falsas (FPSR). Por tanto, las reacciones positivas deben confirmarse con estrategias confirmativas (que incluyan tanto la realización de otras pruebas como la investigación epidemiológica) (OIE. 2004).

Estos sueros falsos positivos se debe a la presencia de anticuerpos no específicos los cuales no solo aglutinan con Brucellas, sino con otras bacterias como Proteus, Salmonella y Alkaligenes; su presencia es la responsables de estas reacciones. La actividad de estos anticuerpos es inhibida si la reacción se realiza con el antígeno de brucella a un pH de 3,65 en el cual la actividad de los anticuerpos contra brucelas no son afectados. Cualquier reacción de aglutinación es considerada positiva.

Tiene como ventaja el identificar animales con títulos bajos y con infecciones crónicas, que pueden ser negativos a otras pruebas de aglutinación.

La especificidad esta dada por el pH y la concentración salina del antígeno; las inmunoglobulinas afectadas son las IgM, más que las IgG1 o IgG2 y como la IgM es producida, principalmente, como respuesta a la vacunación con cepa 19; se llega a la conclusión que la reacción con la IgM puede explicar las reacciones falsas positivas. La IgM es inmunoglobulina no específica, que resulta afectada por el pH, quedando activas las IgG, y de ellas la IgG1 permanece activa (Navarro, F. 1995).

Las reacciones negativas falsas se producen muy raramente, sobre todo debido a los fenómenos de prozona y en ocasiones se pueden detectar diluyendo la muestra de suero o volviendo a probarla después de 4–6 semanas. Sin embargo, la RB es un técnica adecuada para detectar rebaños infectados o para garantizar la ausencia de infección en rebaños libres de brucelosis (OIE. 2004).

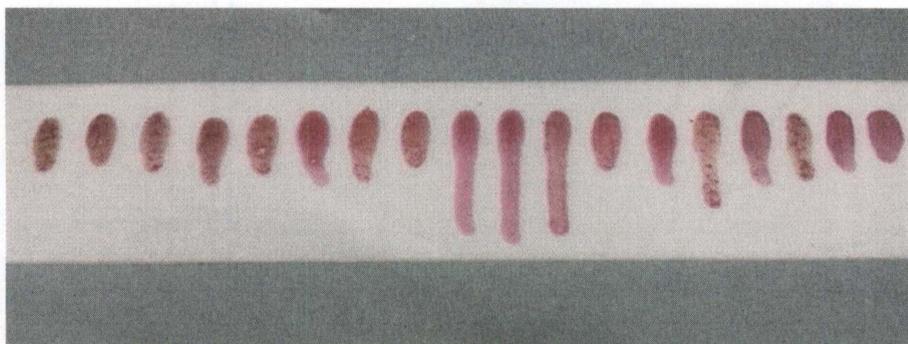


Figura 2. Muestras de suero con reacciones positivas y negativas a RB. Daniela Rosas.

➔ Prueba de Rivanol

Esta técnica junto a Fijación del complemento y Mercaptoetanol son las pruebas confirmatorias fijadas por la Legislación Nacional e Internacional sobre Brucelosis Bovina. En caso de ser necesaria estas pruebas confirmatorias serán efectuadas por los Laboratorios Oficiales dependientes de la DILAVE. Los resultados de las pruebas diagnósticas de establecimientos, plantas de faena y centros de comercialización de animales, así como, los resultados de los análisis bacteriológicos deberán ser comunicados de inmediato a los propietarios o responsables de los establecimientos y a los Servicios Veterinarios regionales de la Dirección de Sanidad Animal (Chans, L. 2003). Fue descrita por Anderson (1964) y consta de dos fases: la primera consiste en la precipitación de las proteínas (albúmina y macroglobulinas) con excepción de las IgG, utilizando una solución de Rivanol (lactato de 2 etoxi-6-9-diamino acridina), por lo tanto el Rivanol sirve para separar las IgG de las IgM detectando así el mismo tipo de anticuerpo que el 2-ME y la segunda estriba en una aglutinación rápida empleando antígeno de aglutinación en placas, especial para esta prueba, ajustando el pH de 3.8 - 6.2 y con una concentración celular del 4%. Esta menor concentración celular determina una mayor sensibilidad que compensa la dilución al 50% del suero, ocasionada por la previa adición del Rivanol. Las globulinas del sobrenadante están en relación con la cantidad de Rivanol añadido y con la especie animal de que procede el suero tratado (Casas Olascoaga, R. 1976). La principal limitación de la prueba es que solamente se puede realizar en laboratorios que posean el antígeno especial para su ejecución (Alton, G. 1976). En Uruguay como el resultado de esta prueba determina la necesidad de eliminación del reaccionante esta prueba solo es realizada en forma oficial.

El suero problema, el antígeno y la solución de Rivanol deben estar a temperatura ambiente por lo menos una hora antes de realizar la prueba. Tanto el antígeno como la solución de Rivanol fueron proporcionados por la DILAVE.

Se elaboró para la realización de la prueba una placa de vidrio dividida en cuadrados de 3,5 cm de lado y una caja "aglutinoscopio" con fondo negro y luz indirecta.

En líneas generales la técnica se realiza en la forma siguiente:

- a) En un tubo pequeño (13 x 100 mm), depositar 0,4 ml del suero problema. Agregar 0,4 ml de solución Rivanol y mezclar bien agitando el tubo, dejar a temperatura ambiente no menos de 10 minutos y no más de una hora.
- b) Centrifugar las mezclas a 1000 xg (aproximadamente 2000 r.p.m. en un cabezal de 23 cm de radio total hasta el extremo del portatubo), durante 5 a 10 minutos.
- c) Con pipeta serológica Bang, aspirar el líquido sobrenadante y hacer una prueba de aglutinación. En una placa de vidrio clara y limpia, depositar cantidades de 0,08: 0,04: 0,02 y 0,01 ml.
- d) Agregar una gota (0,03 ml) de antígeno Rivanol a cada cantidad de líquido sobrenadante, mezclar con un palillo mondadientes o agitador múltiple, comenzando con la cantidad más pequeña (0,01 ml). Cada dilución debe ser

extendida de forma que cubra la superficie indicada para la prueba estándar de aglutinación en placas (18, 21, 24 y 27 ml respectivamente).

- e) Si se usa un agitador metálico, enjuagarlo y secarlo bien antes de pasarlo a la muestra siguiente.
- f) Inclinar la placa imprimiéndole movimientos circulares y haciéndola girar cuatro veces. Preparar el reloj para que suene a los 12 minutos.
- g) Transcurridos 6 minutos, girar cuatro veces la placa en la forma indicada en el punto anterior. A los 12 minutos rotar nuevamente la placa y efectuar la lectura con luz indirecta sobre fondo negro.

El Rivanol es una técnica semi-cualitativa y como ya se mencionó es utilizada en Uruguay como técnica confirmatoria.

Para facilitar las lecturas y la comparación con los resultados en otras pruebas se acepta denominar a las diluciones obtenidas como de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 respectivamente.

El resultado se expresa en función de la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

Se consideran positivos los sueros que aglutinen a dilución 1:50 o mayor.

El Rivanol puede causar cierta precipitación de inmunoglobulinas IgG, por lo cual el título final puede ser inferior al obtenido con la prueba de Mercaptoetanol.

➔ *Polarización Fluorescente (FPA)*

Entre las nuevas técnicas, consideramos profundizar la descripción de la polarización fluorescente la cual se ha incorporado recientemente en diversos países para el diagnóstico de la brucelosis.

El FPA es un ensayo homogéneo que no requiere la eliminación de los reactivos sin reaccionar y, por consiguiente, llevar a cabo muy rápidamente y, teniendo en cuenta el equipo portátil, en el laboratorio y en el campo. Este último evita la necesidad de envío de muestras y elimina la espera de los resultados, así como la reducción de costos de las pruebas. La tecnología FPA ha sido elaborado y validado para el diagnóstico serológico de la brucelosis en el ganado vacuno, cerdos, ovejas, cabras, bisontes y cérvidos (Nielsen, K., Gall, D. 2001) . El mecanismo se basa en la rotación aleatoria de las moléculas en solución. El tamaño molecular es el factor principal que influencia la velocidad de rotación. Por ejemplo, una molécula pequeña gira a una velocidad más alta que una molécula grande. En este caso la molécula pequeña es el antígeno (*Brucella abortus*) marcado con isotiocianato de fluoresceína que emitirá una reacción que puede medirse por la luz polarizada. Sin embargo, si esta molécula se une a los anticuerpos en solución, aumentará su tamaño y la velocidad de rotación de las mismas descenderá, provocando una medida menor.

El FPA se hace en tubos aunque puede hacerse también en placas de 96 pocillos: luego de diluir el suero bovino 1-100 en buffer específico, se coloca en 2 ml de dicho buffer y se lee en un lector de polarización de fluorescencia (Sentry 100) para una

muestra, lo que otorgará la lectura en blanco. Seguidamente se le agrega el antígeno, se espera dos minutos, se vuelve a leer y se obtiene el resultado definitivo (Figura 3). Las medidas de lectura se expresan en unidades de milipolarización (umP). Sin embargo, cada país debe efectuar su validación para determinar el corte de la misma. Por ejemplo Canadá, determinó que el corte para el diagnóstico serológico de bovinos debe ser 90 umP. No obstante, este país no vacuna contra la brucelosis bovina. Entonces, aquellos países que no vacunan o que emplean la vacuna RB51 de *B abortus* que no induce títulos serológicos, podrían utilizar esta medida, aunque siempre es conveniente efectuar un estudio propio. Aquellos países que utilicen la vacuna cepa 19 para la prevención de la brucelosis bovina deben emplear otro corte. De todos modos, esta técnica es capaz de discriminar animales vacunados con cepa 19 de aquellos infectados con *B. abortus* a partir de los 45-60 días post vacunación, contribuyendo en una gran medida a evitar la eliminación de animales falso positivos.

Esta técnica se emplea actualmente para el diagnóstico de brucelosis bovina, porcina y caprina, donde obviamente los puntos de corte varían en cada especie. Además, diversos trabajos concluyen que es una excelente técnica para el diagnóstico de brucelosis en búfalos, bisontes y camélidos (Samartino, L. 2007). El FPA se desarrolló inicialmente para las pruebas de suero, sin embargo, la tecnología se ha extendido a análisis de sangre entera y leche de animales individuales o muestras de tanque agrupados de 2000 o menos animales. La precisión de la FPA es igual o superior a los obtenidos con otras pruebas serológicas como la prueba de aglutinación en placa con antígeno tamponado (BPAT), la prueba de anillo en leche (MRT), la prueba de fijación de complemento (CFT), el inmunoensayo enzimático indirecto (IELISA), y el inmunoensayo enzimático competitivo (CELISA) (Nielsen, K., Gall, D. 2001).

Una de las ventajas prácticas de esta técnica es la facilidad de la implementación y su rapidez, lo que permite obtener un diagnóstico rápido y preciso en pocos minutos. Esto que contribuye a una comunicación rápida del mismo con implicaciones importantes en el control de esta enfermedad (Samartino, L. 2007).

En comparación con los test convencionales, FPA presenta la ventaja de ser de ejecución más rápida y más fácil y no estar sujeto a fenómenos de prozona, como fijación del complemento o 2 mercaptoetanol, ni de actividades complementarias como fijación del complemento.

El primer trabajo aplicado a esta técnica de diagnóstico de brucelosis bovina fue desarrollado por Nielsen et al. (1996). Estos autores relataron que el análisis de 8669 sueros de rebaños canadienses libres de brucelosis resultaron en una especificidad de 99.96%, y el testeo de 561 sueros de animales de los que había sido aislada *Brucella abortus* mostró una sensibilidad de 99.02%. Los autores también evaluaron 250 sueros de animales vacunados con cepa 19 y obtuvieron una especificidad del 99.2%. Estos resultados también mostraron la capacidad de la prueba de combinar elevada sensibilidad con elevada especificidad y mostraron además que la especificidad es alta incluso cuando es usado para probar sueros de animales vacunados (Mathias, L., 2010)

En líneas generales esta técnica se realiza de la siguiente manera:

- a) Se comienza centrifugando bien las muestras (que deben encontrarse junto con los reactivos a temperatura ambiente $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) de manera que no se encuentren partículas visibles, se pueden utilizar muestras hemolizadas.
- b) Para realizar el FPA se adicionaron 1ml de buffer (diluido 1/25 en agua destilada) en un tubo de 10 x 75 ml agregándole 10 μl de control negativo, mezclar con agitador Vortex. Esta es la muestra Blanco.
- c) Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- d) En el polarizador ir a *Calibrate*, presionar *Select*, y posicionarse en *Blank int*. Pasar el tubo por el Vortex y colocarlo en el lector FP. Presionar *Read*. Realizar 5 a 10 lecturas de Blanco para estabilizar las medidas.
- e) Añadir 10 μl de conjugado. Agitar en el Vortex e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- f) Agitar nuevamente en Vortex y medir en el lector FP, posicionándose en el ítem *Sample int*. El polarímetro da el resultado expresado en unidades mP (milipolarización)
- g) Si la lectura del control negativo se encuentra entre 65 y 80 mP significa que el aparato está calibrado. Si la lectura es menor, debo corregir el factor G. El factor G y la unidades mP son inversamente proporcionales, por lo tanto debo bajar el valor de G para que aumenten las unidades mP. Cada un punto que baja el G aumenta una unidad mP. Para cambiar el G, ir a *G factor* presionar *Edit*, digitar el nuevo valor y luego *Done*. **El valor G debe estar entre 0.8 y 1.2.**
- h) Ahora volver a medir la muestra (buffer + control negativo + conjugado). Para medir posicionarse en *Sample int* y leer. Si el control ahora da entre los valores deseados ya está calibrado. Si no se debe seguir corrigiendo el G hasta obtener los valores esperados, siempre leyendo en *Sample int* porque si se mide en *Blank int* se pierde la lectura del blanco y hay que hacer todo de nuevo.

Procesamiento:

- 1- Preparar las diluciones de cada muestra y de los controles, utilizando el buffer del kit (BIOTANDIL DIAGNÓSTICOS) como diluyente. Se preparan las diluciones de suero bovino: 1/100. Por cada suero a procesar se coloca 1ml de buffer específico en cada tubo de vidrio de 10 x 75 mm de tamaño.
- 2- Con pipeta automática, renovando los tips por cada suero, se colocan 10 μl de cada muestra de suero a diagnosticar en cada tubo correspondiente conteniendo el buffer y se agita enérgicamente (Vortex). Evitar ensuciar el tubo con el manipuleo.
- 3- Se introduce dicho tubo en el polarímetro para obtener el valor blanco (es conveniente hacer una marca en la parte superior del tubo de vidrio, para luego colocarlo en igual posición).
- 4- Con pipeta automática o dispensador se colocan 10 μl de antígeno brucélico en cada uno de los tubos, luego se agita enérgicamente (Vortex).
- 5- Dejar en reposo durante 2 minutos como mínimo.

6- Reintroducir cada tubo en el polarímetro en el orden correspondiente a la lectura de los valores blancos, obteniendo así el valor final en unidades de minipolarización (mP).

Nota: con los sueros control (positivo y negativo), proceder igualmente.

Interpretación de los resultados

Los resultados se expresan en unidades de minipolarización (mP). Los sueros fueron designados como negativos con 0 a 95 mP y positivo con 95 mP o superior.

Polarización Fluorescente

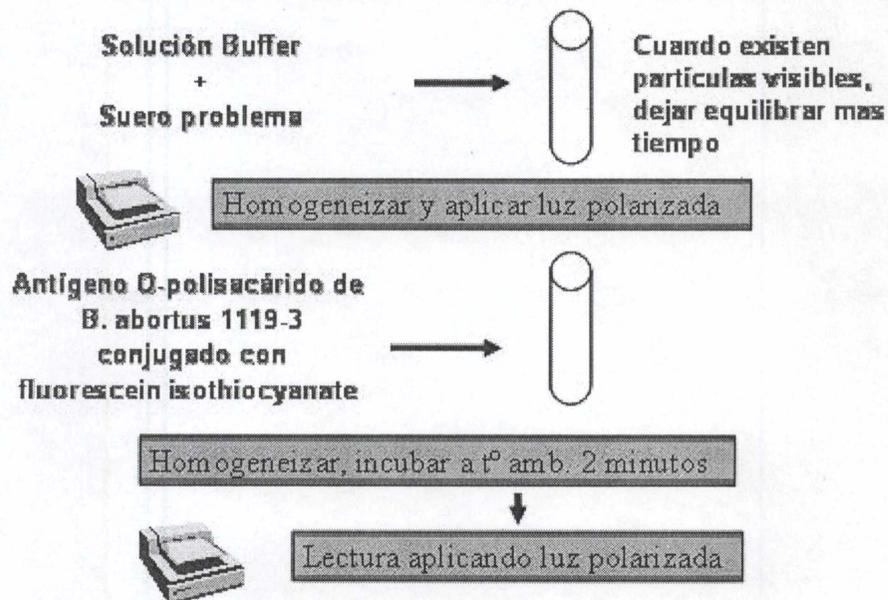


Figura 3. Diagrama de la realización del ensayo de FPA



Figura 4. Imagen del polarizador Diachemix

➔ ELISA

El kit de ensayo inmunoenzimático (ELISA) CHEKiT- Brucellose- Serum, proporciona un método rápido, simple, sensible y específico para detectar anticuerpos frente a *Brucella abortus*, en suero o plasma individual y en mezclas de hasta 10 sueros o plasmas de rumiantes.

La prueba de I-ELISA es muy sensible, pero a veces no es capaz de distinguir entre anticuerpos debidos a vacunación por S19 u otros problemas a reacciones positivas falsas y los inducidos por cepas patógenas de *Brucella*. Por consiguiente, la prueba de I-ELISA debe considerarse como una prueba de análisis más que como una prueba confirmatoria. (OIE 2004)

Las placas de micro-titulación se suministran tapizadas con un antígeno inactivado de *Brucella abortus*. Las diluciones de las muestras que van a ser procesadas se incuban en los pocillos de dichas placas. Cualquier anticuerpo específico frente a *B. abortus* se une al antígeno que tapiza los pocillos y forma un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. El material que no ha quedado unido se elimina de los pocillos mediante lavado. A continuación se añade un conjugado formado por una IgG anti-rumiante unida a la enzima peroxidasa, el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos que formaron el complejo con el antígeno de *B. abortus*. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, y un sustrato TMB es añadido a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica medida a 450nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente a *B. abortus* presente en la muestra. La relevancia diagnóstica del proceso se obtiene comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra, con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo.

Para la validación de la placa la densidad óptica del control positivo no debería ser superior a 2.0 y la densidad óptica del negativo no debería exceder de 0.5. La diferencia de la densidad óptica entre los controles positivo y negativo debe ser ≥ 0.3 . Las placas deben ser leídas dentro de un período máximo de dos horas tras la adición de la solución de frenado.

Para los cálculos se debe obtener el valor medio de la densidad óptica de las muestras duplicadas. La densidad óptica del control positivo (DO_{pos}) así como la densidad óptica de las muestras ($DO_{muestra}$) deben corregirse restándoles el valor de la densidad óptica del control negativo (DO_{neg}).

El valor de cada muestra debe calcularse con relación al control negativo y positivo con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de la muestra (\%)} = \frac{(DO_{muestra}) - (DO_{neg})}{(DO_{pos}) - (DO_{neg})} \times 100\%$$

Interpretación de los resultados

Interpretación de muestra individual

Valor	< 80 %	≥ 80%
Interpretación	Negativo	Positivo

Interpretación para mezclas de 10 sueros o plasmas

Valor	< 30 %	≥ 30%
Interpretación	Negativo	No negativo

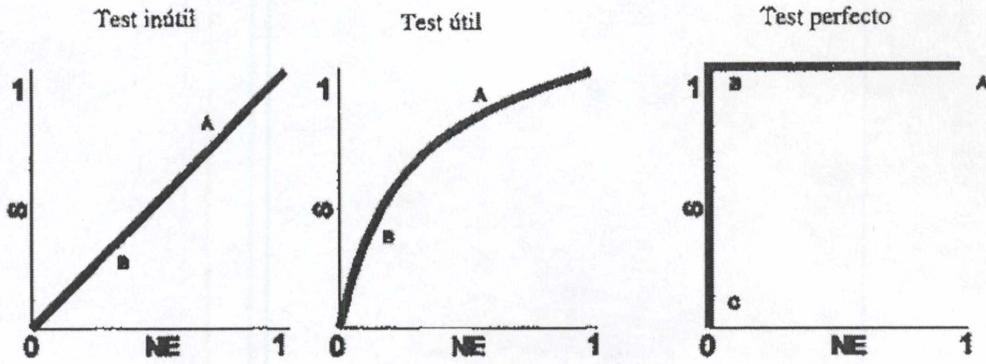
Si una mezcla ofrece un resultado no negativo después de una segunda prueba, será necesario analizar las muestras que componen la mezcla de forma individual. (Manual IDEXX)

Análisis estadístico

Se analizó la sensibilidad y especificidad de las técnicas de I-ELISA y PFA, estimadas en relación a los positivos y negativos a Rosa de Bengala y Rivanol.

A las pruebas con valores cuantitativos, se les realizó curvas **ROC** (Receiver operating characteristic). A través del análisis de las curvas ROC comparamos la eficacia de las pruebas: ELISA indirecta y Polarización fluorescente. El análisis de curvas **ROC** proporciona una medida global de precisión diagnóstica, independiente del punto de corte y de la prevalencia. Permite comparar la eficacia de diferentes pruebas diagnósticas aplicadas a una misma muestra (como es nuestro caso) o de una misma prueba aplicada a diferentes muestras. La curva **ROC** se obtiene representando la sensibilidad (porcentaje de verdaderos positivos), en el eje de ordenadas, y la inespecificidad (porcentaje de falsos positivos), en el eje de abscisas, para diferentes puntos de corte aplicados sobre el resultado cuantitativo de un test. Así pues, la curva **ROC** es independiente del punto de corte y de la prevalencia, cumpliendo así las dos condiciones enunciada por Swets (1988) como imprescindibles en un indicador de precisión diagnóstica. La curva **ROC** refleja el

grado de solapamiento de las puntuaciones del test en los grupos de animales sanos y enfermos (véase Figura 5).



A, B, C: Puntos de corte; S: Sensibilidad; NE: Inespecificidad

Figura 5. Curvas ROC según el solapamiento de las puntuaciones del test entre sanos y enfermos.

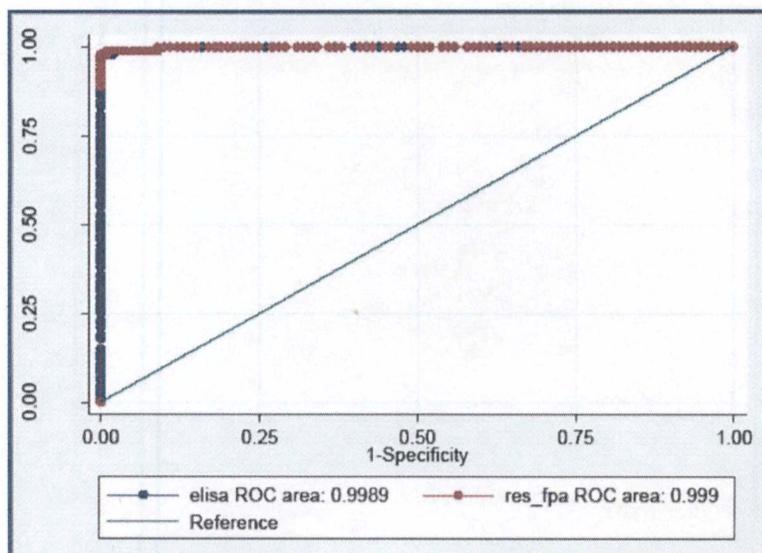
Cuando el solapamiento es total (test inútil) la curva **ROC** recorre la diagonal positiva del gráfico, ya que para cualquier punto de corte sensibilidad (S) es igual a inespecificidad (NE). Cuando el solapamiento es nulo (test perfecto), la curva **ROC** recorre los bordes izquierdo y superior del gráfico, ya que para cualquier punto o bien $S=1$ o bien $NE=0$. El área (W) bajo toda la curva (Simpson y Fitter, 1973) se ha convertido en el índice de resumen de una curva ROC más utilizado. El área bajo la curva de una prueba inútil es 0.5, reflejando que al emplearlo como prueba diagnóstica solo clasifica correctamente un 50% de individuos (es lo mismo que el azar), por el contrario, el área bajo la curva de una prueba perfecta es 1, ya que permite clasificar sin error el 100% de sujetos (Blas Navarro, R y col., 2003).

Para la determinación de la sensibilidad analítica se realizaron pruebas a través de diluciones seriadas (con formación de pooles) con la utilización de los sueros positivos diluidos con los negativos. Las diluciones se realizaron en una escala logarítmica en base 2.

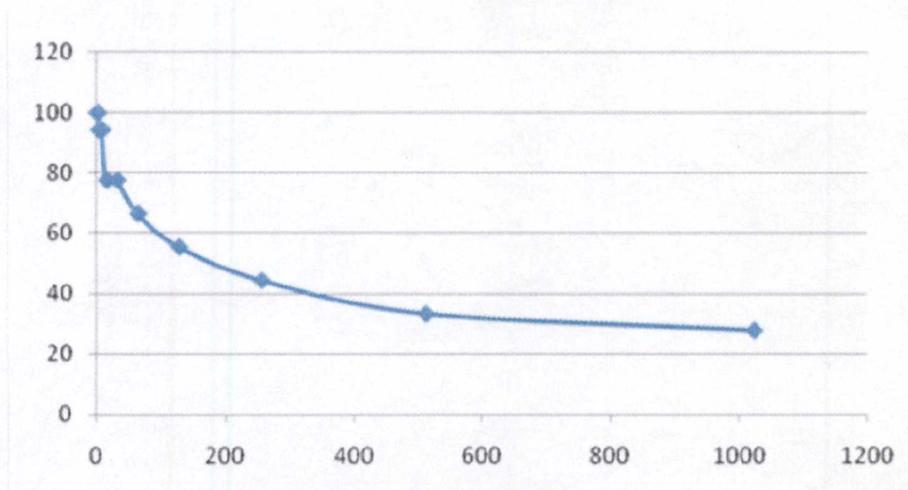
Los sueros para la determinación de la sensibilidad analítica se extrajeron de focos de predios con Brucelosis, los mismos revelaron resultados positivos a Rosa de Bengala y Rivanol.

RESULTADOS

Curva ROC para las pruebas de Polarización Fluorescente y I-ELISA. Este análisis genera los gráficos de la sensibilidad (verdaderos positivos) en función de los falsos positivos (1-Especificidad) para cada posible punto de corte de las pruebas.



Grafica de las diluciones en función de la sensibilidad para la técnica de I-ELISA



dil	c _{elisa}	
	0	Sens
1	0.00	100.00
2	0.00	100.00
4	5.56	94.44
8	5.56	94.44
16	22.22	77.78
32	22.22	77.78
64	33.33	66.67
128	44.44	55.56
256	55.56	44.44
512	66.67	33.33
1024	72.22	27.78

Figura 8. Sensibilidad analítica

DISCUSIÓN

Por ser la brucelosis bovina una enfermedad considerada por los organismos internacionales como la zoonosis más difundida en el mundo y causante de graves pérdidas económicas tanto para la salud pública, como para la producción animal y por las pérdidas en los mercados nacionales e internacionales, deberíamos poner énfasis en utilizar nuevas herramientas para la vigilancia epidemiológica. Haciendo énfasis en implementar técnicas diagnósticas más económicas, sensibles y específicas que detecten todas las etapas de infección y puedan utilizarse a gran escala.

Luego de la implementación de las técnicas de Polarización Fluorescente y I-Elisa (Ambas pruebas recomendadas por la OIE para aplicar en el comercio internacional) en sueros bovinos para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus*, pude ver que son técnicas prácticas que podrían ser implementadas con un mínimo de entrenamiento previo. Si bien los costos iniciales en equipos para su implementación son importantes, el beneficio que da la eficacia de ambas pruebas es superior al de las pruebas que se utilizan en la actualidad.

Además que estas técnicas tienen la ventaja de ser objetivas limitando de esta manera el error humano, conjuntamente ambas cuentan con controles positivos y negativos proporcionados por los kit que permite evaluar la calidad de la prueba y ajustar por otras variables importantes (operador, temperatura, calidad de otros reactivos, etc)..

Otra ventaja que se ve en la prueba de Polarización es que puede utilizarse con sangre entera e incluso hemolizada, no teniendo que centrifugar la sangre si se quisiera hacer a nivel de campo, es altamente automatizable, con única incubación sin etapas de lavado, además de poder diferenciar mejor que otras técnicas animales vacunados de aquellos infectados en forma natural.

En la figura 6 se puede apreciar que el área bajo la curva es cercana a 1 por lo cual las pruebas de Polarización fluorescente y I-ELISA serían capaces de identificar casi al 100% de los animales sin error.

Los resultados de la sensibilidad analítica para la técnica de I-ELISA demuestran que si quisiéramos utilizar la prueba como herramienta para la vigilancia epidemiológica de rodeos a menores costos, las diluciones no deberían ser superiores a 1/8 para mantener una alta sensibilidad (94.44%), ya que la prevalencia de la enfermedad en el 2008 en nuestro país según Gil y Piaggio (2010) es de 0.26 % de los animales y un 1.10 % de los predios afectados. Valores que son compatibles con la erradicación.

Según los aranceles fijados por la Sociedad de Medicina Veterinaria el costo de la Prueba de RB es de \$27 x muestra hasta las 40 y de \$ 20 de 41 muestras en adelante. Mientras que la prueba de ELISA y FPA es de U\$S 1.20 por muestra el kit a lo que hay que sumarle los costos de operador e inversión en equipos que podríamos estimar en U\$S 0,8 lo cual llevaría el costo a U\$S 2 por muestra (\$ 40). En cuanto a la comparación entre los precios de las pruebas según Gall y Nielsen (2004) se desprende que las de fijación primaria (FPA y I-ELISA) pueden competir en este terreno con las pruebas convencionales (RB) de diagnóstico de la

brucelosis. Por lo tanto ofrecen una buena relación costo y eficacia. Cuando hablamos de costo nos referimos al sacrificio de animales, interdicción e investigación de los focos, perifocos, proveedores y compradores de animales al rodeo problema.

CONCLUSIONES

Tanto la prueba de FPA como I-ELISA en suero se pudieron implementar para el diagnóstico de brucelosis bovina a nivel individual y de rodeo, siendo ambas pruebas prácticas, pudiendo realizarse con un mínimo de entrenamiento y son de mayor eficiencia.

A través del resultado arrojado de la curva ROC determinamos que la prueba de Polarización Fluorescente en suero es excelente herramienta para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis bovina. Hoy día para la prevalencia que existe de la enfermedad en el país sería importante la validación de nuevas técnicas con una eficacia superior a las que se utilizan actualmente.

Es muy importante la sensibilidad de la prueba (probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo) sin detrimento de la especificidad de la misma (probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano). Debemos minimizar la eliminación de animales sanos y evitar que animales portadores mantengan la infección en el rodeo. No solo por las pérdidas que esto conlleva tanto para el productor como para el país, sino por la pérdida del estatus sanitario en el predio y lo más importante evitamos eliminar animales erróneamente por lo que contribuimos a su bienestar.

A través del análisis de la sensibilidad analítica de la prueba de I-ELISA las muestras compuestas (pooles) no deberían estar integradas por más de 8 sueros. Ya que en nuestras condiciones actuales de prevalencia de la enfermedad no es conveniente disminuir el porcentaje de sensibilidad.

Por esto sugerimos que la prueba FPA es una herramienta muy eficaz para utilizar como prueba tanto de *screening* como confirmatoria en Uruguay y I-ELISA como prueba de *screening* que en caso de positivos se pueden confirmar con una prueba de ELISA de competencia. Ambas pruebas son una alternativa para la vigilancia de rodeos en forma más objetiva y eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altman, DG., Bland, JM., (1994) Diagnostic tests Predictive values. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Valores_predictivos Fecha de consulta: 25 de diciembre de 2011.
2. Alton, G., Jones, M., L. Pietz, D. E., (1976) Las técnicas de laboratorio en brucelosis. 2a. ed. Ginebra, OMS, 169 p.
3. Blas Navarro, J. M. Doménech, J., De La Osa, N., Ezpeleta, N., (1988) El análisis de curvas ROC en análisis epidemiológicos de psicopatología infantil: aplicación del cuestionario. Barcelona CBCL 29:3-15. Disponible en: www.raco.cat/index.php/anuariopsicologia/article/viewFile/61374/88312. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2011.
4. Blood D.C, Radostits O.M (1992) Enfermedades causadas por bacterias. En: Blood D.C, Radostits O.M. Medicina Veterinaria. Atlampa, (Mx) Interamericana. Mc Graw- Hill, p. 729-742.
5. Casas Olascoaga, R. (2008). Brucelosis Bovina. Veterinaria, (Montevideo). 43:11-35.
6. César, D. (2009) Brucelosis Bovina: Una visita que aportó mucho. Sitio Argentino de producción animal. Plan agropecuario. 139:36-40. Disponible en: http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R139/R_139_36.pdf Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2011
7. Chans, L. (2003) Legislación Nacional e Internacional sobre Brucelosis Bovina. Jornadas de Actualización Sobre Brucelosis Bovina 21/03/2003. Rocha-Uruguay. p 1-18
8. D´Anatro, N. (2003) Aislamiento y tipificación de Brucella abortus. Jornadas de Actualización Técnica 21/03/2003. Rocha Uruguay. p 1-3
9. Gall, D., Nielsen, K. (2004) Estudio comparativo del rendimiento y el coste de las pruebas de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 23: 998-999.
10. Gall, D., Nielsen, K. (2004) Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 23: 989-997.
11. García-Carrillo, C. (1982) Pruebas suplementarias para el diagnóstico de la Brucelosis. Nota Técnica Nº 25. Buenos Aires. Centro Panamericano de Zoonosis. 30 p
12. Gil, A., Piaggio., J. (2010) Evaluación de instrumentos de Vigilancia Epidemiológica y desarrollo de herramientas para la toma de decisiones en el

- control y erradicación de la brucelosis bovina. En: Gil, A., Piaggio, J. Evaluación de instrumentos de Vigilancia Epidemiológica y desarrollo de herramientas para la toma de decisiones en el control y erradicación de la brucelosis bovina. INIA FPTA-245 (en prensa). Montevideo-Uruguay. p 3-9.
13. Gil, A., Piaggio, J. (2010) Modelo de difusión de la brucelosis bovina intrarodeos. En: Gil, A., Piaggio, J. Evaluación de instrumentos de Vigilancia Epidemiológica y desarrollo de herramientas para la toma de decisiones en el control y erradicación de la brucelosis bovina. INIA FPTA-245 (en prensa) Montevideo-Uruguay. p 60-73.
 14. Maldonado, J., Kowalski, A., Milla, M., Rodriguez, M., Villasmin, C. (2010) Implementación de la prueba del anillo en leche y ELISA indirecto para el diagnóstico de la Brucelosis en rebaños doble propósito del estado Lara, Venezuela. Rev. Cient. 20:240-244.
 15. Mathias, L., Corbellini, L., Maia, L., Nascimento, K., Paulin, L., Samartino, L., Serqueira, M., Filho, P., Souza, M., (2010) Validacao interlaboratorial do teste de polarizacao fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Ciencia Rural 40 (10):2135-2140.
 16. Navarro, F. (1995) Determinación de la prevalencia serológica de la Brucelosis Bovina en distintas zonas de la República Argentina. Disponible en http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/06-determinacion_de_la_prevalencia.pdf. Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2011
 17. Nielsen, K., Gall, D. (2001) Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. J Immunoassay Immunochem 22(3):183-201 (abstract) Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506271>. Fecha de consulta: 28 de noviembre de 2011
 18. Lyford Pike, V. (2003). El rol de laboratorio en el diagnóstico de la Brucelosis bovina. Jornadas de Actualización sobre Brucelosis Bovina 21/03/2003. Rocha-Uruguay. p 1-4.
 19. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2004) Enfermedades de los Bóvidos de la Lista B. Brucelosis Bovina. En: OIE. Manual de la OIE sobre Animales Terrestres. Paris, OIE. p 445-476.
 20. Pennimpede, E.F.F., Di Lorenzo, C.L (1990) Operating characteristics of tests for serologic diagnosis of bovine Brucellosis. Therios 16 (80): 296-301.
 21. Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., Oñate, A. (2006) *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids. Arch. Med. Vet. 38 (1):7-15.
 22. Samartino, L., Buffoni, L., Conde, S., Gregoret, R. (2001) Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires). 82 (2): 90-94.

- 23.** Samartino, L. (2003) Conceptos generales sobre Brucelosis Bovina. Jornadas de Actualización Sobre Brucelosis Bovina 21/03/2003. Rocha-Uruguay p 1-7.
- 24.** Samartino, L; Salustio, E; Gregoret, R. (2003) Evaluación de la Vacuna RB51 de *Brucella abortus* en hembras bovinas preñadas. Jornadas de Actualización sobre Brucelosis Bovina 21/03/2003. Rocha-Uruguay. p 1-12.
- 25.** Samartino, L., Schust, M., Piazza, E., Salustio, E., Conde, S. (2007) Diagnostic of Animal Brucellosis: Implementation of New Technologies. Arch. Latinoam. Prod. Anim. (Buenos Aires). 15(Supl.1):19-22.
- 26.** Walsh I. (1996) Programa Nacional de control y erradicación de la Brucelosis bovina. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires). 93:72-78.