



Ingeniero Agropecuario por la Escuela Politécnica del Ejército. Diploma superior en Implantación y Gestión de la Calidad con Normas ISO por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Sede Ibarra. Master of Science in Tropical Animal Health por el Institute of Tropical Medicine Antwerp–Belgica. Docente Titular Auxiliar TC en la Escuela de Desarrollo Integral Agropecuario (EDIA) de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi desde 2013.

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

(Entregado 20/05/2013 – Revisado 14/06/2013)

**Centro Internacional de Zoonosis (CIZ)
Institute of Tropical Medicine (ITM), Belgica
Universidad Central del Ecuador (UCE)
Universidad Politécnica Estatal del Carchi (UPEC)
Escuela de Desarrollo Integral Agropecuario (EDIA)
edmaibro@yahoo.es**

RESUMEN

*La presente investigación se realizó: (1) para comparar y evaluar las pruebas diagnósticas para brucelosis en leche, y (2) determinar la correlación entre las pruebas en leche y un análisis bacteriológico. Un total de 484 muestras de leche fueron colectadas de 263 fincas en cinco cantones del Ecuador. El total de las muestras pertenecen a animales posiblemente vacunados con *Brucella abortus* cepa 19 (S19). Un total de 101 muestras (20.9%) dieron resultado positivo a la prueba de anillo en leche (PAL). Once muestras (2.30%) fueron consideradas con diagnostico dudoso en la PAL. El ELISA indirecto en leche (miELISA) clasifico 72.73% de las muestras antes mencionadas con diagnostico dudoso, como positivas, incrementando el número de resultados positivos en el miELISA a 200 (41.3%). De 40 muestras que dieron positivo tanto al PAL como al miELISA, ninguna fue confirmada como positiva por el análisis bacteriológico. Usando análisis Bayesiano se determinó las características (sensibilidad y especificidad) de las pruebas diagnósticas. La sensibilidad del miELISA (99.25%) fue más alta que la PAL (46.11%), pero la especificidad para ambas pruebas (98.5% y 94.92% respectivamente) no presento diferencias estadísticas. La seroprevalencia de brucelosis en leche (40.24) no puede ser considerada real por la falta de información sobre la vacunación en nuestro estudio. El miELISA muestra ser la prueba en leche más eficiente para diagnosticar brucelosis en el Ecuador, donde el estado de vacunación es desconocido.*

Palabras claves: *brucelosis, prueba de anillo en leche, ELISA indirecto, análisis Bayesiano, Ecuador*

ABSTRACT

Enero – Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica / Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del Carchi)

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

This study was carried out (1) to compare and evaluate the most common milk brucellosis diagnostic tests, and (2) to determine the correlation between the milk tests and bacteriological tests. About 484 milk samples, were collected from 263 farms in five cantons of Ecuador. The total of samples are from cattle possibly vaccinated with B. abortus strain 19 (S19). A total of 101 samples (20.9%) showed a positive result in the Milk Ring Test (MRT). Eleven samples (2.30%) were considered as inconclusive diagnostically in the MRT. The milk iELISA (miELISA) classified 72.73% of these inconclusive diagnostically samples as positives, raising the number of positive results in the miELISA to 200 (41.3%). From 40 milk samples that gave positive results both to MRT and miELISA, none was confirmed as positive by bacteriological tests. Using a Bayesian approach the test characteristics (sensitivity and specificity) were estimated. The sensitivity of the miELISA (99.25%) was higher than the MRT (46.11%) but the specificity of miELISA and MRT (98.5% and 94.92% respectively) were not statistically different. The high prevalence found (40.24) was not considered as true because of the lack of data about the vaccination in our study. The miELISA shows be the most efficient test to screen brucellosis in dairy herds in Ecuador, were the vaccination status is unknown.

Keywords: *brucellosis, milk, milk ring test, indirect ELISA, bayesian analysis, Ecuador.*

INTRODUCCIÓN

Brucelosis es una enfermedad bacteriana infecto – contagiosa causada por especies del genero *Brucella* (OIE, 2004). Esta enfermedad es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como la zoonosis más persistente a nivel mundial (Memish & Balkhy, 2004; OIE, 2004; Pappas *et al.*, 2006; Lucero *et al.*, 2008).

El hombre es solo infectado accidentalmente, a través del contacto con animales infectados o por la ingestión de productos contaminados (Rivera *et al.*, 2003; Memish & Balkhy, 2004). En humanos, la presentación clínica de la enfermedad varía desde: asintomática a cuadros clínicos severos (CFSPH, 2007b; Memish & Balkhy, 2004). En animales, brucelosis causa pérdidas productivas y reproductivas significativas, en una alta variedad de hospederos, donde las consecuencias más comunes son: abortos, orquitis, epididimitis, decrece la producción de leche e higromas (específicamente en países tropicales) (CFSPH, 2007^a; Aguilar, 2000).

A pesar de que brucelosis ha sido controlada y erradicada en muchas partes del mundo, en otros permanece endémica, donde *B. abortus* es la especie más difundida (Acha & Szyfres, 2001). En Ecuador debido a la brucelosis animal, el país fue dividido en tres áreas epidemiológicas: **Región de Alta Prevalencia** (Región 1 y 2) con prevalencias que van de 4 a 10.62 %; **Región de Baja Prevalencia** (Región 3 y 4) con prevalencias entre 1.2 y 2.6 %; y **Región Libre de la Enfermedad** (Islas Galápagos) (MAG-SESA, 1999).

La importancia de Brucelosis es económica y de salud pública (Nicoletti, 2001; Corbel, 2006), razón por la cual, medidas de control y erradicación han sido tomadas a nivel

Enero – Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
 Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
 Carchi)

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

mundial, donde, la vacunación masiva y, el diagnóstico y sacrificio de animales seropositivos han sido las más eficientes (Nicoletti, 2001; Olsen & Stoffregen, 2005). Sin embargo en países subdesarrollados, la calidad de las vacunas y la falta de precisión de las pruebas diagnósticas, no pueden garantizar el éxito de cualquier programa de control y erradicación.

Aunque el aislamiento y la identificación de *Brucella spp.* es considerado como diagnóstico definitivo (Alton *et al.*, 1988), los métodos no son fácilmente disponibles. Actualmente, pruebas moleculares y humorales han sido usadas a nivel mundial, demostrando alta sensibilidad y especificidad (Hernan & De Ridder, 1992; Saegerman *et al.*, 1999); Colmenero *et al.*, 2004). Sin embargo, el diagnóstico rutinario para brucelosis está basado en la detección indirecta de anticuerpos a través de pruebas de aglutinación, pruebas de fijación de complemento y pruebas de unión enzimática (Nielsen, 2002). Para realizar un diagnóstico preliminar sobre brucelosis tanto individual como poblacional, pruebas diagnósticas en leche han sido desarrolladas y validadas a nivel mundial. La prueba de anillo en leche (PAL), ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) indirecto en leche (miELISA) y prueba de fluorescencia polarizada en leche (mFPA) son los métodos más comunes usados a nivel mundial. Pero algunos problemas debido al factor de dilución de la leche, muestras de calostro, leche obtenida en los últimos estados de lactancia, leche proveniente de animales con mastitis y leche de animales vacunados son encontrados en la PAL (Nielsen *et al.*, 1996; Vanzini *et al.*, 2001; Gall *et al.*, 2002). Aunque el miELISA fue desarrollado para superar las dificultades de la PAL, esta no puede discriminar entre anticuerpos vacúnales y anticuerpos de cepas patógenas; contrario a lo sucedido con el mFPA desarrollado por Nielsen & Gall. (2001).

En Ecuador, un proyecto que intenta disminuir el número de animales infectados en las diferentes áreas epidemiológicas para brucelosis fue desarrollado por el SESA. Sin embargo para cumplir este objetivo, pruebas diagnósticas eficientes son requeridas. El presente estudio fue realizado en el norte de Ecuador, considerado una de las más importantes zonas lecheras del país. Al no contar con una prueba “Gold Standard” para brucelosis, la estimación de las características (sensibilidad y especificidad) de las pruebas diagnósticas fue hecho usando un análisis Bayesiano (Branscum *et al.*, 2005; Berkvens *et al.*, 2006; Muma *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Descripción del Área

El presente estudio se llevó a cabo en cinco cantones del norte de Ecuador: tres en la provincia del Carchi (Tulcán, Espejo y Huaca), uno en la provincia de Imbabura (Ibarra) y uno en la provincia de Sucumbíos (Sucumbíos).

1.2. Esquema de Muestreo

Para el muestreo cuatro centros de acopio y/o procesamiento de leche fueron seleccionados: uno en Imbabura (Floralp S.A.) y tres en Carchi (Rey Leche, Productos Lacteos Gloria S.A. y Centro de Acopio Ortega). Doscientas sesenta y tres fincas fueron muestreadas en el periodo de Enero a Junio de 2007, dando un total de 484 muestras de leche mezcladas (varios animales). El total de muestras provienen de una población de

Enero - Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
Carchi)

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

vacas posiblemente vacunadas con *B. abortus* cepa 19 (S19). Las muestras de leche fueron colectadas a nivel de finca de cada una de las cantinas de leche o de los tanques de enfriamiento (promedio 1.84 muestras por finca), así como también un cuestionario fue llenado al momento del muestreo.

1.3. Diagnóstico

La PAL en muestras de leche (n=484) fue realizada en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador. Las muestras fueron refrigeradas (4°C) durante 24 horas antes de la prueba y luego congeladas a -20°C. Luego las muestras fueron transportadas congeladas al Centro de Investigaciones Veterinarias y Agroquímicas (CODA-CERVA-VAR) en Bélgica, donde el miELISA y el análisis bacteriológico fueron realizados.

1.3.1. Prueba de Anillo en Leche (PAL)

La PAL fue realizada usando la técnica descrita por Godfroid & Boelaert (1995, citado por Ron, 2003). El antígeno y las muestras se llevaron a temperatura ambiente por 60 minutos antes de su uso. Luego, 1 ml de cada muestra homogenizada fue puesta en un tubo con una pipeta automática (Eppendorf®); seguido de 50 µl del antígeno (suspensión de *B. abortus* cepa 99 de Weybridge inactivada y coloreada con hematoxilina). Después fue homogenizada suavemente e incubada a 37°C por 1 hora.

Interpretación: El resultado fue considerado positivo cuando se forma un anillo coloreado de crema en la parte superior del tubo.

1.3.2. ELISA Indirecto en Leche (miELISA)

El miELISA fue desarrollado siguiendo las instrucciones de Godfroid & Boelaert (1995). Los buffers y soluciones usadas fueron: **GS buffer** (glicina [1 M], cloruro de sodio [1.7 M] y agua desmineralizada pH 9.2 (ajustada con NaOH)), **GS-EDTA-Tw buffer** (GS buffer, EDTA [50 mM], tween 80® 0.1% (V) pH 9.2), **Proteína G-HRPO buffer** (hidrogeno fosfato di sódico [10 mM], cloruro de sodio [150 mM], tween 80® 0.1% (V), agua desmineralizada pH 7.2 (ajustada con HCl)), **Sustrato buffer** (1 pastilla de buffer citrato fosfato en 100 ml de agua desmineralizada), **Solución de Lavado (SL)** (NaCl [0.15 M], tween 20® 0.01% (V), agua desmineralizada), **Proteína G-HRPO Solución** (Proteína G – HRPO, suero de feto bovino (2%), proteína G – HRPO buffer 10 ml), **Solución de Sustrato** (1 tableta de oPD (o-phenilenedianimine) [10 mg], sustrato buffer (25 ml), peróxido de hidrogeno [30 %] (5 µl)) y **Solución de Parada** (Ácido Sulfúrico [2 M]). Los platos de ELISA fueron cubiertos con 0.1 ml por pocillo de 1 µg/ml de Lipo-polisacárido (LPS) (10 mg/ml) en GS buffer diluido 50 veces a pH 9.2 ± 0.1. Los platos fueron cubiertos e incubados por 3 h a 37°C ± 3°C y luego por 18 h a 5°C ± 3°C. En 1ml de cada muestra de leche homogenizada se colocó 50 µl de fenol y luego se almaceno por 48 h a 5°C. Luego, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 12000 rpm; el sobrenadante fue diluido 1/2 en GS-EDTA-Tw buffer. La curva estándar fue preparada en diluciones seriadas (de 1/270 a 1/8640) usando como referencia el control positivo (Control Positivo 1121 de Bélgica) en GS-EDTA-Tw buffer con 2% de

Enero – Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
Carchi)

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

suero negativo (FCS). La última dilución (1/8640) fue probado 2 veces en cada plato ELISA. El plato fue lavado 5 veces con SL antes de usarse; luego 0.05 ml de la curva estándar, el control negativo, el GS-EDTA-Tw buffer y las muestras diluidas fueron transferidas en duplicado a cada pocillo del plato ELISA. El plato fue incubado por 1 h a temperatura ambiente (20 ± 5 °C). Luego el plato fue lavado 5 veces usando SL; además se adiciono 0.05 ml de proteína G-HRPO (1/25000) en cada copula del plato. El plato fue incubado por 1 h a temperatura ambiente (20 ± 5 °C). A continuación, el plato fue lavado 5 veces usando SL y se adiciono 0.1 ml de solución de sustrato para cada copula. El plato fue incubado a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) en la oscuridad por alrededor de 10 a 15 min, misma que depende de una pre-lectura en el espectrofotómetro de la dilución 1/8640, la cual debe dar un valor de 0.050. Luego la reacción debe ser detenida adicionando 0.025 ml de la solución de parada. Las densidades ópticas (DO) fueron leídas por un espectrofotómetro con filtros de 492 nm y 620 nm. Las unidades ELISA son definidas usando las DO de la curva estándar usando una escala (la curva estándar tiene un rango de 60 y 1.875).

Interpretación: Muestras con unidades ELISA superiores a 2 fueron consideradas positivas.

1.3.3. Análisis Bacteriológico

Las muestras de leche fueron almacenadas a 4°C por 48 horas antes del cultivo. Para el cultivo, suero y grasa fueron puestos en el medio de cultivo Columbia usando isotopos estériles. Las cajas fueron incubadas a 37°C en una atmosfera suplementada con 10% de CO₂ por 10 días. Luego, la primera lectura fue hecha usando luz indirecta. Las colonias supuestas de *Brucella* spp. fueron sub-cultivadas y leídas nuevamente luego de 10 días. Como protocolo de confirmación, las colonias supuestas fueron analizadas por microscopía y por pruebas de aglutinación para colonias lisas de *Brucella* spp.

1.4. Análisis Estadístico

La falta de una prueba perfecta de referencia para determinar un estado de infección real contra brucelosis, hace imposible estimar directamente la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas (Branscum *et al.*, 2005; Berkvens *et al.*, 2006; Muma *et al.*, 2007). Sin embargo, Berkvens *et al.* (2006) describió un modelo Bayesiano, el cual se basa en la integración de información de campo e información a priori, para estimar las características de las pruebas diagnósticas (sensibilidad y especificidad) y la prevalencia de una enfermedad en la ausencia de una prueba perfecta o “Gold standard”.

En virtud que ninguna de las pruebas en leche usadas en este estudio puede ser considerada como referencia, los datos fueron analizados usando enfoques bayesianos. El análisis Bayesiano fue corrido con los siguientes supuestos: (1) dependencia condicional entre las pruebas, (2) sensibilidad y especificidad del miELISA 99.6% (CI 98.6- 99.9 %) y 98.6% (CI 98-99 %) respectivamente, basado en muestras de animales vacunados con *B. abortus* cepa 19 y la prueba de Fijación de Complemento como prueba “gold standard” (Vanzini *et al.*, 1998) y (3) el efecto de dilución de las muestras. El modelo fue escrito y corrido por el Prof. Dr Ir D.Berkvens usando WinBUGS Version 1.4.

Enero – Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
 Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
 Garchi)

RESULTADOS

El total de muestras (484) fueron divididas en grupos: cantinas < 40 l. (n=164), cantinas = 40 l. (296) y tanques de enfriamiento (n=24). Las muestras fueron divididas en grupos basados en el tipo de almacenamiento de la leche a nivel de finca, para evaluar el factor de dilución.

3.3.1. Resultados Prueba de Anillo en Leche

Del total de resultados (Tabla I) 20.9% son positivos. Once (2.3%) fueron consideradas con diagnóstico dudoso. La regresión logística muestra diferencias estadísticas ($P < 0.001$) entre cantinas < 40 l y cantinas = 40 l. No existe diferencias estadísticas entre cantinas < 40 l y tanque de enfriamiento ($P=0.123$), y entre cantinas = 40 l y tanques de enfriamiento ($P=0.460$).

Tabla I: Resultados PAL por grupos

| Muestra | Total Muestras Diagnosticadas | Resultado | | | | Resultado Dudoso | % |
|------------------------|-------------------------------------|-----------|------|----------|------|---------------------|-----|
| | | Positivo | % | Negativo | % | | |
| Cantina < 40 | 164 | 16 | 9.8 | 146 | 89.0 | 2 | 1.2 |
| Cantina = 40 | 296 | 80 | 27.0 | 207 | 69.9 | 9 | 3.0 |
| Tanque Frio | 24 | 5 | 20.8 | 19 | 79.2 | 0 | 0 |
| Total | 484 | 101 | 20.9 | 372 | 76.9 | 11 | 2.3 |

3.3.2. Resultados ELISA indirecto en leche (miELISA)

Los resultados al miELISA (Tabla II) muestra 41.3% resultados positivos. Las 11 muestras con diagnóstico dudoso en la PAL, fueron diagnosticadas por el miELISA, permitiendo clasificar 72.7% de estas como positivas. La regresión logística muestra diferencias estadísticas ($P < 0.001$) entre cantinas < 40 l y cantinas = 40 l. No se encontraron diferencias estadísticas entre cantinas < 40 l y tanques de enfriamiento ($P=0.138$), y entre cantinas = 40 l y tanques fríos ($P = 0.472$).

Tabla II: Resultados miELISA por grupos

| Muestras | Total Muestras Diagnosticadas | Resultado | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------|------|----------|------|
| | | Positivo | % | Negativo | % |
| Cantina <40 l | 164 | 44 | 26.8 | 120 | 73.2 |
| Cantina =40 l | 296 | 146 | 49.3 | 150 | 50.7 |
| Tanque Frio | 24 | 10 | 41.7 | 14 | 58.3 |
| Total | 484 | 200 | 41.3 | 284 | 58.7 |

3.3.3. Resultados del Análisis Bacteriológico

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

Cuarenta muestras de leche que dieron resultados positivos tanto al PAL como al miELISA fueron cultivados. Ninguna de las muestras fue confirmada como positiva tanto por microscopia como por pruebas de aglutinación, luego de 20 días de cultivo.

3.3.4. Análisis de Concordancia

Tabla III presenta los resultados de concordancia entre la PAL y miELISA por grupos. Ochenta y nueve muestras fueron positivas a ambas pruebas, 104 fueron positivas solo al miELISA y 12 fueron positivas solo a la PAL. La regresión logística muestra diferencias estadísticas ($P < 0.001$) entre PAL y miELISA. Las once muestras con diagnóstico dudoso no fueron consideradas para este análisis.

Tabla III: Resultados relacionados de PAL y miELISA por grupos.

| Pruebas | | Total | Muestras | | |
|---------|-----|-------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| miELISA | PAL | | Cantina < 40 l (n=162) | Cantina = 40 l (n=287) | T. Frio (n=24) |
| + | + | 89 | 14 | 70 | 5 |
| + | - | 104 | 29 | 70 | 5 |
| - | + | 12 | 2 | 10 | 0 |
| - | - | 268 | 117 | 137 | 14 |

3.3.5. Análisis Bayesiano

La sensibilidad y la especificidad de la PAL y miELISA, así como la prevalencia fueron estimados combinando datos de la Tabla III (datos de campo) e información a priori (ver materiales y métodos), a través de enfoques bayesianos. La mayor sensibilidad se logró con el miELISA. Similar especificidad se encontró tanto en la PAL como en miELISA.

Tabla IV: Estimación de la Sensibilidad y Especificidad de la PAL y miELISA

| Pruebas | Sensibilidad (%) | | Especificidad (%) | |
|------------------------|------------------|---------------|-------------------|---------------|
| | Media | 97.5% CI | Media | 97.5% CI |
| MRT | 46.11 | 38.67 - 53.36 | 94.92 | 92.08 - 97.23 |
| miELISA | 99.25 | 98.63 - 99.87 | 98.5 | 98.03 - 98.98 |
| Prevalencia (%) | 40.24 | | | |

DISCUSIÓN

Eficientes pruebas diagnósticas son indispensables para el éxito de cualquier programa de control y erradicación de enfermedades. Aunque para brucelosis, el aislamiento y la identificación de especies de *Brucella* es considerado un diagnóstico positivo y confiable, en el contexto Ecuatoriano no es muy factible, por lo que, rutinariamente, el diagnóstico se basa en pruebas indirectas en suero. Pruebas en leche para realizar un diagnóstico preliminar de brucelosis, han demostrado ser los métodos más eficientes, esto debido a su fácil recolección y su bajo costo.

Enero - Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
Carchi)

Las pruebas de leche, en este estudio, fueron divididas en grupos, para evaluar la eficacia de las pruebas diagnósticas en leche, cuando son sometidas al conocido problema de dilución.

Basado en nuestros resultados, se encontró diferencias estadísticas entre cantinas < 40 l y cantinas = 40 l, ambas tanto en la PAL y el miELISA, denotando la importancia del muestreo de capa recipiente de almacenamiento de leche. Contrario a esto, en Ecuador es tomado una sola muestra diluida por finca.

Nuestro estudio demostró que el miELISA tiene la ventaja de analizar muestras con diagnóstico dudoso en la PAL, causado por leche congelada, leche acida, leche con poca o mucha crema. Esto debido al hecho de que el miELISA depende directamente de la presencia de anticuerpos, mientras que la PAL está condicionado a que los anticuerpos se unan a moléculas de grasa, misma que es condicionada por la calidad de la leche. Observaciones similares fueron descritas por Rivera *et al.* (2003).

Usando análisis bayesianos la sensibilidad y especificidad de las pruebas en leche para brucelosis fueron estimadas en una población de bovinos posiblemente vacunados con S19 sea en terneras o adultos. Para este análisis se asumió dependencia condicionada, toda vez que las pruebas tienen el mismo principio biológico (detección de anticuerpos) (Toft *et al.*, 2005; Branscum *et al.*, 2005; Berkvens *et al.*, 2006), aunque las pruebas son basadas en técnicas diferentes. El efecto de dilución usado como información a priori, sigue las siguientes consideraciones: leche diluida 1:10 puede interferir en los resultados de la PAL, como lo menciona Kerkhofs *et al.* (1990), Vanzini *et al.* (2001) y Rivera *et al.* (2003), y leche diluida 1:100 puede interferir en los resultados del miELISA, como lo menciona Nielsen *et al.* (1996b) y Vanzini *et al.* (2001). El miELISA demostró ser la prueba más eficiente para realizar un diagnóstico preliminar de brucelosis en ganado bovino bajo las condiciones Ecuatorianas, debido a que logro las mayores valores de sensibilidad y especificidad (ver Tabla IV). Similares resultados fueron obtenidos por Kerkhofs *et al.* (1990), Nielsen *et al.* (1996b) y Vanzini *et al.* (2001) basados en: muestras de una región prevalente para Brucelosis, muestras de Ganado infectado con *B. abortus* de Argentina y Chile, y muestras preparadas en laboratorio respectivamente.

La alta sensibilidad observada tanto a la PAL como al miELISA son atribuidos a que los valores de sensibilidad y especificada usados como información a priori, implican que el miELISA es casi una prueba perfecta cuando CFT es usado como prueba de referencia. Sin embargo, el CFT como prueba de referencia debido a los problemas de reacciones falsas negativas, esto principalmente debido a reacciones de anti-complementariedad y prozona. Como lo menciona Sutherland (1985), Hobbs, 1985 citado por Kerby *et al.* (1997), Ron (2003) y Angulo (2006).

La alta sensibilidad estimada en el miELISA se debe a la presencia dominante de IgG₁ en la leche, así como también la alta sensibilidad analítica de la prueba, como lo menciona Kerkhofs *et al.* (1990). La baja sensibilidad de la PAL, pueden ser atribuidos al hecho que las IgG₁ no están implicadas directamente en la formación del anillo, contrario a lo que pasa con las IgA y IgM las cuales son esenciales para un resultado positivo en la PAL, tal como lo demostró Sutra *et al.* (1986). Otro problema, el cual juega un rol importante en los resultados de la PAL, es el factor de dilución, como lo

Enero - Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
 Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
 Carchi)

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

menciona Kerkhofs *et al.* (1990), Nielsen *et al.* (1996b) y Vanzini *et al.* (2001). No se encontró diferencias estadísticas entre la especificidad de la PAL y el miELISA. Resultados similares fueron obtenidos por Kerkhofs *et al.* (1990), Vanzini & De Echaide (2005), Lopez *et al.* (1998), Vanzini *et al.* (2001), y Rivera *et al.* (2003).

Los resultados de la Tabla III muestra 104 resultados positivos al miELISA pero negativos a la PAL, lo cual sugiere que la PAL produce más resultados falsos negativos, que puede ser atribuido al hecho que durante al momento del muestreo no hubo infección a nivel de glándulas mamarias como lo menciona Rivera *et al.* (2003). La condición de almacenamiento de las muestras y el factor de dilución también puede ser considerada para los resultados de la PAL (Vanzini *et al.*, 2001; Rivera *et al.*, 2003). Doce muestras fueron positivas solamente a la PAL, esto sugiere que la PAL produce más resultados falsos positivos que el miELISA. Esto puede ser debido a factores como los que mencionan Nielsen *et al.* (1996b), Gall *et al.* (2002) y Rivera *et al.* (2003) cuando realizan las pruebas en: leche colectada al inicio de la lactancia, leche de los últimos días de la lactancia, calostro y leche de animales con mastitis. Aunque reacciones cruzadas con algunas bacterias y con anticuerpos vacunales has sido descritos como causa de resultados falsos positivos en al menos todas las pruebas para brucelosis (Olsen *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 2005), el problema de reacciones cruzadas debido a anticuerpos vacunales no pudo ser manejada en nuestro estudio porque las fincas muestreadas no registran datos de vacunación. El mismo fenómeno fue observado por Ron (2003) and Angulo (2006).

Boraker *et al.* (1981) encontró una correlación alta entre la PAL, miELISA y análisis bacteriológico. En nuestro estudio ninguna de las muestras positivas tanto a la PAL como al miELISA, fue confirmado como positiva en el análisis bacteriológico. Esto puede ser explicado debido a que *B. abortus* relativamente aparece en cantidades muy pequeñas en la leche, estados de infección tempranos donde los anticuerpos están presentes pero la bacteria no y a esto sumado la mala conservación de las muestras, tal como lo mencionan Hunter & Allen (1972).

La alta prevalencia de la enfermedad, no debe ser considerada como real debido a la falta de información sobre el estatus de vacunación contra brucelosis en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

- El miELISA es la prueba más eficiente para realizar un diagnóstico preliminar sobre brucelosis en ganado lechero en el contexto Ecuatoriano debido a su alta sensibilidad. Esto puede ser mejorado si el muestreo se lo hace de cada recipiente de almacenamiento de leche a nivel de finca.
- La calidad de la muestra de leche no influye en el diagnóstico con miELISA, pero cuando el objetivo es el aislamiento de *Brucella* es importante tener en cuenta la calidad de la leche y las condiciones de almacenamiento.
- El uso de CFT solo como prueba de referencia es cuestionable, pero como complemento de otras pruebas serológicas puede arrojar información muy valiosa.

Enero - Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
Carchi)

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que cuando se tiene resultados positivos en leche a nivel de finca, todas las vacas de esa propiedad deben ser muestreadas individualmente, con el fin de determinar el animal infectado.
- Es importante realizar investigaciones que permitan determinar la asociación de la enfermedad entre la infección en animales y la enfermedad en humanos.
- La evaluación de pruebas serológicas en animales vacunados deben ser altamente revisadas, con el fin de determinar una prueba capaz de distinguir entre animales vacunadas y naturalmente infectados.
- El manejo de registros de vacunación debe ser implementado en Ecuador, debido a que es importante para determinar el verdadero estado sanitario de los animales, y además que puede apoyar en el éxito de cualquier programa de control y erradicación para brucelosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha, P. & Szyfres, B. (2001). *Brucellosis. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. Washington: Pan American Health Organization. p. 40-65.
- Aguilar, F. (2000). *Brucellosis Bovina. In: Diagnostico De Brucelosis Animal*. Mexico: E.Diaz editors. México. p. 120- 125.
- Alton, G. G., Jones, L., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Angúlo, A. (2006). *Survey of Bovine Brucellosis in Ecuador: Performance of Five Diagnostic Tests*. Thesis N° 50. Belgium: Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Tropical Animal Health Department.
- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A. & Lesaffre, E. (2006). *Estimating Disease Prevalence in Bayesian Framework Using Probabilistic Constraints*. Journal of Epidemiology 17: 145-153.
- Boraker, D.K., Stinebring, W.R. & Kunkel, J.R. (1981). *Brucelisa - An Enzyme-Antibody Immunoassay for Detection of Brucella-Abortus Antibodies in Milk - Correlation with the Brucella Ring Test and with Shedding of Viable Organisms*. Journal of Clinical Microbiology 14: 396-403.
- Branscum, A.J., Gardner, I.A. & Johnson, W.O. (2005). *Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling*. Preventive Veterinary Medicine 68: 145-163.
- CFSPH. (2007a). *Bovine Brucellosis: Brucella abortus*. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_abortus.pdf
- CFSPH. (2007b). *Brucellosis*. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>.
- Colmenero, J.D., Queipo-Ortuno, M.I. & Morata, P. (2004). *Polymerase Chain Reaction: A Powerful New Approach for the Diagnosis of Human Brucellosis. In: Brucella: Molecular and Cellular Biology*. I.Lopez-Goni & I.Moriyon, editors. Horizon Bioscience. Wymondham, p. 53-68.
- Corbel, M. J., (2006). *Brucellosis in Humans and Animals*. Geneva: WHO-FAO-OIE.
- Gall, D., Nielsen, K., Bermudez, M.R., Moreno, F. & Smith, P. (2002). *Fluorescence polarization assay for detection of Brucella abortus antibodies in bulk tank bovine milk samples*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9: 1356-1360.

Enero - Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
Carchi)

Evaluación comparativa de pruebas diagnósticas en leche para brucelosis en el Norte de Ecuador

- Sutherland, S.S. (1985). *Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay and Complement-Fixation Test for the Detection of Specific Antibody in Cattle Vaccinated and Challenged with Brucella-Abortus*. Journal of Clinical Microbiology 22: 44-47.
- Sutra, L., Caffin, J.P. & Dubray, G. (1986). *Role of Milk Immunoglobulins in the Brucella Milk Ring Test*. Veterinary Microbiology 12: 359-366.
- Toft, N., Jorgensen, E. & Hojsgaard, S. (2005). *Diagnosing diagnostic tests: evaluating the assumptions underlying the estimation of sensitivity and specificity in the absence of a gold standard*. Preventive Veterinary Medicine 68: 19-33.
- Vanzini, V. & De Echaide, T. (2005). *Eficacia de una prueba ELISA en muestras de leche para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis bovina*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Estación experimental Rafaela.
- Vanzini, V.R., Aguirre, N.R., Lugaresi, C.I., De Echaide, S.T., de Canavesio, V.G., Guglielmone, A.A., Marchesino, M.D. & Nielsen, K. (1998). *Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina*. Preventive Veterinary Medicine 36: 211-217.
- Vanzini, V.R., Aguirre, N.R., Valentini, B.S., De Echaide, S.T., Lugaresi, C.I., Marchesino, M.D. & Nielsen, K. (2001). *Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to Brucella abortus in bulk milk samples*. Veterinary Microbiology 82: 55-60.

Enero – Junio 2013

Mgs. Edison Marcelo Ibarra Rosero

(Centro Internacional de Zoonosis / Institute of Tropical Medicine, Bélgica /
Universidad Central del Ecuador / Universidad Politécnica Estatal del
Carchi)