

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO.

Evaluación de tres ensayos diagnósticos frente a Brucelosis bovina, durante el período agosto 2016 - febrero de 2017.

Tesistas:

Br: Osman Elieser Cardoza Carmona.

Br: Fernando Javier Gutiérrez Jaime.

Tutor: Dr. Migdonio R. Quintanilla Darce.

León, 04 de septiembre de 2017.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”



AGRADECIMIENTO.

Osman Elieser Cardoza Carmona.

Agradezco en primer lugar a Dios, el ser que ha estado conmigo siempre y me ha regalado el conocimiento, la paciencia, y orientación para realizar de una manera idónea este trabajo, todo se lo debo a él.

A mis Madres: **María Josefa Carmona, María de Jesús P. Carmona y Emma Carmona Alvarado** así como a mis 3 hermanos que me acompañaron, orientaron, y confiaron en todo momento en que podría lograr una vez más este reto de mi vida.

A cada uno de mis maestros de la Escuela de Medicina veterinaria por sus conocimientos transmitidos, por su esmero en infundir con paciencia y dedicación lo necesario para mi formación como profesional, capaz de afrontar las diversas situaciones que en mi vida laboral experimentare.

A **Keyvin D Gaitán López** mi novia, mis amigos (**Sofía Romero Gutiérrez**) y compañeros de clase y todas esas personas que colaboraron en mi proceso de formación.



Fernando Javier Gutiérrez Jaime

Agradezco en primer lugar a Dios, el ser más maravilloso que ha estado con migo siempre y me ha regalado el conocimiento, la paciencia, y por haberme respondido cada vez que le pedía orientación para realizar de una manera idónea este trabajo, todo se lo debo a él.

A mis padres: **Juan Humberto G. Gutiérrez** y **Flor de María Jaime**, ya que me apoyaron incondicionalmente y confiaron en todo momento en que podría lograr una vez más este reto de mi vida, por el amor maravilloso con el que siempre han estado ahí para ayudarme.

A cada uno de mis maestros de la Escuela de Ciencias Agraria y Veterinaria, por sus conocimientos transmitidos, por su esmero en infundir con paciencia y dedicación lo necesario para mi formación como profesional, en especial: Dr. Migdinio Quintanilla, Dr. José L. Bonilla, Dr. Daniel Morales y Lic. Rembrandt José Gutiérrez, por brindarme ese apoyo incondicional lleno de enseñanzas y conocimientos que fortalecen mi futuro como profesional.

A mis Hermanos y amiga **Sofía Alejandra Romero Gutiérrez**, ya que estuvo apoyándome y motivándome en todo momento.



DEDICATORIA.

Osman Elieser Cardoza Carmona.

Esta tesis la dedico primeramente a Dios, padre que ha estado con migo en cada momento de la vida, dándome la sabiduría el discernimiento para realizar cada cosa de la mejor manera.

En segunda instancia se la dedico a mi madre, hermanos e hijo , el regalo más precioso que el señor me ha regalado en esta vida, después de su hijo Jesucristo, ellos que con su gran esfuerzo me han apoyado en todos los aspectos, han confiado en mí , y han sabido acompañarme dándome fortaleza.

También a mis maestros que trataron de inculcarme todos los conocimientos necesarios para formarme como un profesional íntegro y capaz de resolver las diferentes facetas de la vida laboral y personal.

Por último y no menos importantes se lo dedico a mis amigos, personas que la vida me ha regalado que me dieron ánimo en aquellos momentos en que me sentía desanimado.



Fernando Javier Gutiérrez Jaime.

Esta tesis se lo dedico primeramente a Dios, que ha estado con migo en cada momento de la vida, dándome sabiduría y discernimiento para realizar cada cosa de la mejor manera.

A mi Madre: **Flor de María Jaime** que ha estado conmigo desde que nací dándome su apoyo sentimental y económico, ayudándome a formarme y lograr ser un profesional que la llene de orgullo.

A mi Padre: **Humberto G. Gutiérrez** que toda mi vida a estado conmigo formándome como un hombre de bien capaz de poder enfrentar a cada una de las adversidades que nos pone la vida, dándome su apoyo sentimental, económico, por sus consejos, opiniones, por formarme para saber tomar decisiones en la vida y por todas las cosas que me has enseñado. Gracias.

Evaluación de tres ensayos diagnósticos frente a Brucelosis bovina, durante el período Agosto 2016 - Febrero de 2017.



Tema.

Evaluación de tres ensayos diagnósticos frente a Brucelosis bovina, durante el período Agosto 2016 - Febrero de 2017.



RESUMEN.

La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa de animales domésticos y considerada como una zoonosis de gran importancia en el ámbito pecuario. El objetivo del estudio fue evaluar tres ensayos diagnósticos para la detección de *Brucella abortus* a partir de un banco de sueros de bovinos. Se utilizaron 60 muestras de un banco de suero del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI) de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias, de la UNAN – León, el cual, fueron analizadas por las pruebas de Rosa de Bengala (RB), Rivanol (RIV) y ELISA; posteriormente se estimó la Sensibilidad (Se), la Especificidad (Esp), el Valor Predictivo Positivo (VPP) y el Valor Predictivo Negativo (VPN). Se tomó como Estándar de Oro la prueba de Rivanol. Los resultados fueron presentados en tablas de contingencia, donde la sensibilidad estimada de la prueba RB fue de 95% (IC 83.5 - 98.6%) y la especificidad de 40% (IC 21.9 – 61.3%), el VPP fue de 76% (IC 62.66 - 85.7) y el VPN de 80% (IC 49 – 94.3%); para el caso de la prueba de ELISA la sensibilidad estimada fue de 93% (IC 83.5 - 98.6%) y la especificidad de 80% (IC 58.4 – 91.9%), el VPP fue de 90.5% (IC 77.9 – 96.2%) y el VPN de 88.9% (IC 67.2 – 96.9%). De los resultados obtenidos podemos concluir que la sensibilidad es bastante similar en las pruebas de Rosa de Bengala y ELISA, lo contrario de la especificidad, siendo la prueba de ELISA, más específica que Rosa de Bengala.

Palabras claves: Brucelosis, Rosa de Bengala, Rivanol, ELISA.



INDICE.

N°	CONTENIDO	PÁG.
I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	2
III	JUSTIFICACIÓN	3
IV	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
V	OBJETIVOS	6
VI	MARCO TEÓRICO	7
VII	MATERIAL Y MÉTODO	19
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
IX	CONCLUSIÓN	24
X	RECOMENDACIONES	25
XI	BIBLIOGRAFÍAS	27
	ANEXO	



I. INTRODUCCIÓN.

La brucelosis bovina es una zoonosis ampliamente distribuida a nivel mundial que afecta a animales domésticos y silvestres.

La enfermedad es frecuentemente causada por *Brucella abortus* y algunas veces por *Brucella melitensis*, las cuales presentan una gran capacidad de adaptación a los cambios en el sector pecuario, llámese ganaderías, como también en las especies silvestre es por ello que cambia constantemente su distribución geográfica y epidemiológica.

La detección de anticuerpos frente a *Brucella* en suero, es un método de rutina para el diagnóstico presuntivo de brucelosis bovina en programas de erradicación en países endémicos, tal como lo es en Nicaragua y también para monitorear fincas en países libre de brucelosis, o para realizar diversos movimientos ya sea el traslado de una región a otra o de cualquier otra índole.

El impacto económico de brucelosis en la ganadería bovina es muy representativa debido al daño que causa en la producción, por trastornos reproductivos, pérdidas de neonatos y baja en la producción láctea; además del riesgo zoonótico que representa la *Brucella* para la población humana.

Los ensayos más comunes para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, incluyen Rosa de Bengala, Fijación de Complemento, Rivanol, y ELISA.

Por consiguiente nuestro estudio tiene como objetivo evaluar cada uno de los ensayos diagnósticos que se utilizan para la detección de brucelosis valorando así la eficiencia de cada ensayo, así mismo dar a conocer el comportamiento de las pruebas confirmatorias en las diferentes muestra empleadas en el estudio, con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad que presenta cada ensayo.



II. ANTECEDENTES.

En Francia, 2016, A. Praud, llevó a cabo un estudio donde evaluó tres ELISA competitivo (ELISAc) Rosa de Bengala y un ensayo de Fluorescencia Polarizada (FPA) para el diagnóstico de brucelosis bovina. El cual, de 5111 muestras de suero de vacas adultas analizadas, se estimó la sensibilidad y especificidad de cada ensayo. La mayor sensibilidad la obtuvo el ensayo de FPA con 99% con un intervalo de confianza (IC) del 95%, seguido de ELISAc con 98.4% IC 95% y Rosa de Bengala con una sensibilidad de 97.7% IC 95%. La mayor especificidad la presentaron las pruebas Fijación de Complemento con 99.98% IC 95%, Aglutinación del suero con 99.98% IC 95% y Rosa de Bengala con 99.89% IC 95%.⁽¹¹⁾

En Mongolia, 2013, Wang S¹, realizó un estudio comparativo en el cual evaluaron cinco pruebas serológicas la prueba de aglutinación en placa (PAT), la prueba de Rosa de Bengala en placa (RBPT), el ensayo de aglutinación en tubo (SAT), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y el método inmunológico de oro coloidal (GICA) para analizar la sensibilidad y la especificidad tomando como estándar de oro el SAT. El cual, de 236 muestras de suero analizadas, se estimó la sensibilidad y especificidad de cada ensayo. De las técnicas utilizadas la mayor sensibilidad la obtuvo RBPT con 98.5% y una especificidad de un 75%, seguido por PAT con 97.7% y 70%, el ELISA con 94.8% y 86% pero la sensibilidad menor fue GICA con 94.1% y 81%.⁽²⁰⁾

Bangladesh, 2016, Shamim Ahasan, llevó a cabo un estudio donde evaluaron cuatro pruebas serológicas en paralelo, la prueba de Rosa de Bengala (RBT), el ensayo de aglutinación en tubo (SAT), ELISA indirecto y competitivo, para el diagnóstico de brucelosis en bovinos y caprinos. De 320 muestras analizadas se estimó la sensibilidad y la especificidad de cada ensayo. La mayor sensibilidad fue del SAT con un 78.9% y la más específica fue el ELISA indirecto con un 98.8%.⁽⁸⁾

Costa de Marfil, 2005-2009, Moussa Sanogo, realizó un estudio para evaluar la prevalencia real, sensibilidad y especificidad de las pruebas de Rosa de Bengala (RBT)



y ELISA indirecta en el diagnóstico de brucelosis bovina. Se tomaron 995 muestras de suero recogidas de bovino en todo el periodo anterior las cuales dieron los siguientes resultados. La mayor sensibilidad encontrada fue en ELISAI con 96,1% (intervalo de confianza (IC, 92,7-99,8), mientras que la de la RBT fue de 54,9% (IC, 23,5-95,1). Y la especificidad fue muy alta para ambos ensayos (95,0%; [IC, 91,1-99,6] para el IELISA y 97,7%; [IC, 95,3-99,4] RBT). (9)



III. JUSTIFICACIÓN.

Las pruebas serológicas dan una evidencia indirecta de la infección frente a Brucelosis, cuando éstas son realizadas en forma uniforme y son interpretadas con criterio epidemiológico, constituyen un instrumento práctico para el diagnóstico.

Para interpretar debidamente el resultado del diagnóstico es necesario conocer la dinámica de la evolución de los anticuerpos antibrucela y la evolución de las inmunoglobulinas específicas después de la infección.

Los ensayos laboratoriales utilizados en Nicaragua para el diagnóstico de la brucelosis, se basan en pruebas serológicas, tales como Rosa de Bengala, Rivanol y ELISA; y muy pocas veces se hace uso de pruebas confirmatorias (Rivanol y ELISA), probablemente por el costo que éstas representan y solo se utiliza la de Screening (RB).

La sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas varía, de tal manera que la determinación de la infección frente a Brucelosis en los bovinos, estará en dependencia de la capacidad de los ensayos diagnósticos para detectar los anticuerpos antibrucela al momento que se realice el diagnóstico.

Por tanto, el presente estudio pretende evaluar los diferentes ensayos diagnósticos en la detección de anticuerpos frente a *B. abortus* en bovinos.

En nuestro país no se ha realizado un estudio sobre contrastación de las pruebas diagnósticas Rosa de Bengala, Rivanol y ELISA, para brucelosis en bovinos, para evaluar la efectividad de dichas pruebas por lo cual consideramos de suma importancia realizar un estudio de este tipo, cuyos datos obtenidos servirán para evaluar las pérdidas que en general se sufren, al enviar animales realmente negativos a Brucelosis al no realizar pruebas de confirmación.



IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Qué ensayo diagnóstico muestra mayor confiabilidad en la determinación de la infección por Brucelosis en bovinos?



V. OBJETIVOS.

General:

Evaluar tres ensayos diagnósticos frente a brucelosis bovina, durante el período Agosto 2016 - Febrero de 2017.

Específicos:

- Estimar la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas diagnósticas.
- Estimar los valores predictivos positivos y negativos de cada una de las pruebas diagnósticas.
- Divulgar los resultados obtenidos a las autoridades competentes, para mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica frente a brucelosis bovina.



VI. MARCO TEORICO

Concepto.

La brucelosis es una enfermedad compleja, aunque la sintomatología varía según la especie, la característica principal es la infección del tracto reproductivo con tendencia a la cronicidad, tanto en hembras como en machos. Es considerada una enfermedad infectocontagiosa, zoonótica de origen bacteriano de curso crónico, causada por *Brucella* sp y se caracteriza por aborto en hembra o nacimiento de terneros débiles, retención placentaria, y en machos enteros infertilidad debido a orquitis y epididimitis. (5, 10, 13, 19,4).

Etiología

El Género *Brucella* está incluido en la Familia *Brucellaceae*, Orden Eubacteriales y se define como: pequeños cocobacilos gram negativos, no esporulados y sin motilidad. El Género *Brucella* incluye seis especies diferentes:

Especie	Género	Hospedador
<i>B. abortus</i>	Lisa	Ganado vacuno, cerdo, roedores, hombre.
<i>B. suis</i>	Lisa	Cerdo, hombre.
<i>B. melitensis</i>	Lisa	Cabra, oveja, hombre.
<i>B. ovis</i>	Rugosa	Carnero
<i>B. canis</i>	Rugosa	Canino, hombre.
<i>B. neotomae</i>	Lisa	Roedores

Fuente:(16, 5, 4, 19)

En los medios de cultivo ordinarios la *Brucella* muy pocas veces logra reproducirse y pueden incluso requerir medios especiales. Son aerobios y no prosperan en condiciones estrictamente anaerobias. Su desarrollo se mejora frecuentemente por la acción de CO₂, Cada una de estas especies no son específicas para cada tipo de animal, sino solo actúa con preferencia en cada caso.



La diferencia entre las distintas especies de *Brucella*, está dada por la estructura nucleotídica del ácido desoxirribonucleico (ADN) de 55 a 58 % de guanina-citosina. Esta constitución nucleotídica es característica solamente de la especies del género *Brucella*, los géneros restantes de la familia *Brucellaceae* poseen una constitución de ADN diferente. (5, 10,13, 19,4).

Características:

- ❖ Es relativamente resistente y puede sobrevivir por bastante tiempo, el ambiente no es considerado como una fuente importante de infección.
- ❖ En climas secos sobreviven contenidas en material proteico, unos diez días en agua corriente a temperatura de 25°C, 2 años y medio a 0°C en tejidos y varios años en tejidos o medios congelados.
- ❖ Sobrevivencia: 2 meses en quesos, 2 meses en suelos húmedos, 5 meses a 20°C 40 % de humedad relativa, 1 mes en la orina.
- ❖ Puede aislarse de diversos órganos como piel, ganglios linfáticos, ubres, testículos y útero, así también podemos encontrarlo en diversas secreciones como son: leche, orina, loquias, terneros abortados, heces y semen. (10, 19, 4).

Epidemiología

La infección por dicha bacteria afecta en todas las edades, pero persiste mayormente en animales sexualmente maduros, en los que las pérdidas de productividad pueden ser de gran importancia, principalmente por el descenso de la producción láctea. La infertilidad como secuela, aumenta el periodo entre lactancias y el promedio entre partos, que puede prolongarse durante varios meses. (5, 10, 12, 19, 4,1).).

Esta enfermedad es de gran importancia en salud humana, por tratarse de una zoonosis mayor. En humanos, la infección ocurre por consumo queso, leche fermentada y leche sin pasteurizar, además es de tipo ocupacional, ya que se observa en granjeros,



veterinarios y carniceros que manejan animales o productos contaminados con la bacteria. (5, 10, 12, 19, 4,1).).

Mecanismo de transmisión.

1. Vertical: madre a hijo en útero, periparto.
2. Horizontal directo: enfermo a sano, lamen el aparato genital en épocas de celo, consumo de material contaminado después del parto.
3. Horizontal indirecto: fómites, agua y alimentos contaminados. (5, 10, 12, 19, 4).

Vías de entrada:

1. Alimentaria/ oral (Ingesta de alimentos contaminados)
2. Por inseminación artificial.
3. Yatrogénica. (5, 10, 12, 19, 4).

Vías de eliminación:

Líquidos placentarios, placenta, secreciones de los órganos genitales, leche, esperma, orina, heces. ((5, 10, 12, 19, 4).

Patogenia

Cualquiera que sea la vía de entrada, las bacterias son fagocitadas por las células polimorfonucleares (PMN) y macrófagos como parte de la inmunidad innata y cuando no son eliminadas son transportadas a los ganglios linfáticos regionales, si la vía de entrada fue oral será los ganglios retrofaríngeos, si fue genital serán los ganglios inguinales e iliacos. A partir de este episodio se produce una linfadenopatía luego invade el torrente sanguíneo donde son fagocitadas por los PMN y macrófagos circulantes y transportarse de esta manera a los diversos órganos como, bazo, hígado, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, vesículas seminales y medula ósea, donde puede sobrevivir y



multiplicarse dentro de los neutrófilos durante el curso de la infección y ser transportados a los tejidos linfoides. (16, 19,4)

En el animal gestante el microorganismo tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria, afectar el feto y producir abortos a partir de los 45 días de preñez. (5, 10, 12, 19, 4).

La *Brucella* afecta principalmente al aparato reproductor de la hembra por tener afinidad a un azúcar llamado eritritol capaz de producir el crecimiento de *B. abortus* teniendo como resultado la manifestación clínica más destacada el aborto.(5, 10, 12, 19, 4).

Cuadro clínico

El cuadro clínico de la enfermedad no es suficiente para establecer un diagnóstico certero. La enfermedad es muy insidiosa debido a que los animales infectados, frecuentemente parecen clínicamente sanos y por tanto pueden ocasionar gran cantidad de daño. Como consecuencia de que la enfermedad se puede diseminar rápidamente antes de ser detectada. (10, 13, 19, 4).

Brucelosis bovina (*B. abortus*) En el ganado bovino, causa abortos, mortinatos y terneros débiles; los abortos generalmente ocurren durante la segunda mitad del período de gestación. Es posible que la placenta quede retenida y disminuya la lactancia. Después del primer aborto, las preñeces subsiguientes son generalmente normales; sin embargo, las vacas pueden eliminar el organismo en la leche y en las descargas uterinas. En los toros, algunas veces se observa epididimitis, vesiculitis seminal, orquitis y abscesos testiculares. En ocasiones se produce infertilidad en ambos sexos, debido a metritis u orquitis/epididimitis. Se puede manifestar artritis después de infecciones prolongadas. Los signos sistémicos normalmente no aparecen en infecciones no complicadas, y las muertes son raras, salvo en el feto y el recién nacido. En general las hembras infectadas pero no gestantes no presentan síntomas. Se presentan síntomas similares en otros rumiantes como los camellos, bisontes y los búfalos de agua; sin



embargo, los alces americanos infectados en forma experimental desarrollan la enfermedad de manera más grave y mueren rápidamente. . (5, 10, 12, 19, 4).

Brucelosis como zoonosis

Los humanos se infectan al entrar en contacto con los animales o productos animales que están contaminados con la bacteria. La brucelosis humana presenta manifestaciones clínicas muy polimorfas, a veces es asintomática. Puede afectar a cualquier órgano o sistema. Los síntomas y signos iniciales son, a menudo, inespecíficos y no existe ninguna asociación sindrómica que se pueda considerar patognomónica. La gravedad de la infección depende de la presencia de enfermedad subyacente, del estado inmunitario del huésped y de la especie de *Brucella* causante de la misma, así ***B. suis*** es mucho más patógena para el hombre y ***B. Mellitensis*** suele producir una enfermedad más grave que ***B. abortus*** y ***B. canis***. (15, 19, 4).

Las formas más frecuentes son: Osteoarticular (20%-35%): sacroileitis uni o bilateral, artritis periféricas y espondilitis. Genitourinarias (2%-20%): orquiepididimitis unilateral, la forma necrotizante es infrecuente y puede no responder a tratamiento antibiótico y requerir orquidectomía, Meningitis aguda o Meningoencefalitis, Endocarditis, Absceso hepático y entre otras: incluyen abscesos esplénicos, tiroides o epidurales. Neumonitis, derrame pleural, empiema, colecistitis, uveítis e infección de prótesis y marcapasos. (15, 19, 4).

Diagnostico

Animales reactivos a la prueba de tarjeta se confirma con la prueba de Fijación de complemento, Rivanol y ELISA. (14, 19, 4, 17,18)



Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas dan una evidencia indirecta de la infección, que cuando son efectuadas en forma uniforme y se las interpreta con criterio epidemiológico constituyen el instrumento más práctico para el diagnóstico. Para poder interpretar debidamente el resultado del diagnóstico es necesario conocer la dinámica de la evolución de los anticuerpos antibrucela, la evolución de las inmunoglobulinas específicas después de la infección con una cepa virulenta de campo así como después de la vacunación con la cepa 19. ((14, 19, 4, 17,18)

Las inmunoglobulinas en brucelosis

El término inmunoglobulinas comprende las proteínas que poseen actividad de anticuerpo. Las principales inmunoglobulinas (Ig) que nos conciernen en Brucelosis son la M y la G. Se reconocen en el bovino dos subclases de IgG: la IgG 1 y la IgG 2. La IgG 1 es la más abundante en el suero y secreciones lácteas mientras que la IgG 2 se encuentra en concentraciones más bajas, pero puede aumentar en determinadas circunstancias. La IgA fue poco estudiada en Brucelosis. (14, 19, 4, 17,18)

Principales características de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas IgM e IgG se diferencian entre otras características por su peso molecular, constante de sedimentación, estabilidad al calor, movilidad electroforética, resistencia al mercaptoetanol, precipitación por el Rivanol que es un compuesto de la acridina e inhibición por pH bajo. (14, 19, 4, 17,18)

Evolución de las inmunoglobulinas en animales vacunados e infectados.

La vacunación con la cepa 19 estimula la aparición de Ig M al cabo de unos 5-7 días y alcanzan su máxima concentración a las 2-3 semanas. Luego su concentración en el suero va reduciéndose pero sin desaparecer durante varios meses. (14, 19, 4, 17,18)



Las IgG aparecen casi al mismo tiempo, o algo más tarde, y alcanzan su máxima concentración de 28 a 42 días después de la vacunación. Estas inmunoglobulinas desaparecen más rápidamente que las IgM, perdurando unos 6 meses después de la vacunación de terneras jóvenes. (14, 19, 4, 17,18)

La infección natural o experimental con cepas de *Brucella abortus* virulentas va seguida de la formación de IgM e IgG, pero la concentración de IgM declina, mientras que la IgG tiende a persistir. En animales con Brucelosis crónica la IgG es la inmunoglobulina principal y a veces la única detectable. En consecuencia, la diferencia principal entre animales vacunados e infectados es la perdurabilidad de la IgG. (14, 19, 4, 17,18)

IgG.

En las fincas que se encuentran en proceso de erradicar la infección o ya fue erradicada, interesa evitar al máximo la interferencia que puedan tener los anticuerpos originados por la vacunación con el diagnóstico de la enfermedad. (14, 19, 4, 17,18)

Cuanto más joven es el animal al vacunar tanto más rápidamente desaparecen los anticuerpos post vacunales. Cuando se vacunan terneras de 4 a 6 meses o de 8 meses de edad, se puede observar, que los anticuerpos a títulos significativos no solo desaparecen más rápidamente en terneras vacunadas entre 4 y 6 meses de edad, sino que el nivel de la IgG es mucho menor y menos persistente que cuando se vacunan animales a los 8 meses y con más razón a mayor edad. (14, 19, 4, 17,18)

Pautas de IgM e IgG en animales infectados no vacunados y vacunados.

Cuando un animal es infectado natural o experimentalmente, aparecen primero los anticuerpos IgM y al poco tiempo las IgG. Durante el curso de la infección empezara a predominar las inmunoglobulinas G, manteniendo un nivel más alto que las IgM. Cuando una hembra vacunada se infecta por una cepa virulenta, los anticuerpos IgG reaparecen más pronto debido a la memoria inmunológica. (14, 19, 4, 17,18)



Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se han clasificado según el uso que se les da en diferentes países en:

- 1.- Pruebas de rutina
- 2.- Pruebas complementarias
- 3.- Pruebas de vigilancia epidemiológica
- 4.- Pruebas tamizaje o de screening (14, 19, 4, 17,18)

Una misma prueba puede servir en un programa de prueba operativa y ser definitiva para el diagnóstico o ser la prueba tamizaje o complementaria en otro programa. Esta diversidad de aplicaciones de una prueba u otra depende grandemente de la situación epidemiológica de la región o país, de la cobertura vacunal de las terneras y de la infraestructura de los servicios veterinarios especialmente la disponibilidad y calidad de los laboratorios de diagnóstico. (14, 19, 4, 17,18)

La eficacia de una prueba diagnóstica depende de su sensibilidad y de su especificidad, valores que miden la proporción de falsos negativos y de falsos positivos respectivamente. (14, 19, 4, 17,18)

Sensibilidad y Especificidad de las pruebas

Entendemos por sensibilidad de una prueba el grado de capacidad que tiene para detectar animales infectados por el agente específico, en nuestro caso *Brucella*. Ninguna prueba es capaz de descubrir el 100 % de los bovinos infectados de todas las fincas. (14, 19, 4, 17,18)

Por especificidad en cambio medimos el grado de capacidad de la prueba de detectar el mayor número de infecciones específicas y el menor número de "falsos positivos". Una prueba poco específica es causa por consiguiente del sacrificio de animales sanos y de pérdidas económicas innecesarias. (14, 19, 4, 17,18)



Las pruebas de seroaglutinación

En las pruebas de seroaglutinación predominan la reacción con las IgM. Las IgG 1 e IgG 2 difieren en su actividad. La IgG 1 tiene poco poder aglutinante, mientras que la IgG 2 es activa en la prueba. (14, 19, 4, 17,18)

Los falsos positivos.

Los "falsos positivos" en las reacciones se deben a varias causas, tales como anticuerpos residuales por la vacunación con cepa 19 y reacciones cruzadas debidas a anticuerpos originados por bacterias que tienen lipopolisacáridos superficiales similares a los de *Brucella*. El origen de muchas reacciones inespecíficas del bovino no se conoce. Sin embargo se sabe que algunas salmonellas dan reacciones cruzadas. Se ha comprobado que hay una relación antigénica entre *Brucella*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolítica*.

(14, 17,18)

Los falsos negativos.

Los "falsos negativos" en las pruebas de aglutinación se presentan durante el período de incubación es decir desde la exposición a la infección hasta la aparición de las aglutininas. En hembras expuestas por primera vez a la infección durante la gestación es frecuente que las aglutininas aparezcan varios días a dos semanas después del aborto o del parto. Además hay animales infectados que nunca alcanzan un título aglutinante significativo. De especial interés son algunos animales con infección crónica, que se encuentran en las llamadas "fincas problema" y en los cuales las IgM han bajado a un nivel no diagnóstico y casi todos los anticuerpos están constituidos por IgG. Estos animales pueden ser reconocidos por las pruebas complementarias. . (14, 17,18)



Procedimientos a seguir con hembras y machos de reacción sospechosa

Los animales sospechosos a la prueba de aglutinación deben ser examinados en la próxima prueba general de la finca, o si es posible antes, con el fin de clarificar su estado frente a la infección sobre la base del aumento, estabilidad o reducción del título. En toros con títulos bajos es conveniente además de las pruebas complementarias recurrir a la prueba de aglutinación en plasma seminal ya que a veces se comprueban títulos más altos en semen que en suero. . (14, 17,18)

Aspectos importantes en el diagnóstico

El período de incubación en la brucelosis bovina.

En una experiencia realizada en Inglaterra con dosis diferentes de una cepa virulenta el rango de variación del período de incubación fue de 14 a 227 días correspondiendo el periodo más corto a la dosis más alta y el más largo a la dosis menor. (14, 17,18, 19)

El período tan variable de incubación serológica tiene sobretodo dos implicancias a).- en el diagnóstico de animales individuales y b) en la erradicación de la infección de una finca. (14, 17,18, 19)

El diagnóstico en los animales individuales

El período variable de incubación explica la poca confiabilidad que tiene el diagnóstico serológico en animales individuales, si no proceden de fincas libres de brucelosis Un animal individual con reacción negativa a una prueba o aún a una combinación de pruebas, no ofrece garantías si procede de una finca infectada, ya que puede haber sido expuesto a la infección y encontrarse en el período de incubación. (14, 17,18, 4, 19)

Por consiguiente es recomendable que el animal adquirido con un diagnóstico negativo de brucelosis sea mantenido en aislamiento alrededor de 90 días y luego sometido a un nuevo examen. En Nicaragua se procede según el acuerdo ministerial 008 98. (7)



El diagnóstico en hembras preñadas y paridas

Se ha observado que un número de hembras infectantes no desarrollan anticuerpos IgG hasta el parto o una a tres semanas después. Estos animales pueden tener títulos bajos debido a IgM unas semanas antes, pero en una finca vacunada con cepa 19 no hay manera de decidir si se debe a la vacunación o a una infección reciente. (14, 17,18, 4, 19)

El diagnóstico con referencia a edad y sexo.

En los programas de erradicación se exceptúan del diagnóstico bovinos menores de 6 meses de edad. Si bien estos animales pueden infectarse por el calostro y la leche, la infección se acantona en los ganglios y se elimina espontáneamente en la mayoría de los casos. Últimamente se ha demostrado que un número no determinado pero pequeño de terneros que nacen de vacas infectadas pueden haberse infectado intrauterinamente y mantenido una infección latente, sin respuesta inmunológica, revelándose la enfermedad recién durante la primera parición o aborto, cuando acusan reacciones serológicas. (14, 17,18, 4, 19)

Uno o más animales con infección crónica que acusa reacciones a la aglutinación de título no significativo, porque es necesario recurrir a otras pruebas complementarias para descubrirlas. (14, 17,18, 4, 19)

Tratamiento

Por ser la brucelosis una enfermedad de notificación obligatoria y de carácter zoonótico, el tratamiento con antibióticos no es la medida empleada en nuestro país, si no el fusil sanitario, previa serología para controlar la enfermedad, así lo establecen los artículos 2, 9, 10 y 13 de la ley de sanidad animal, Publicado en La Gaceta No. 10 del 12 de Enero de 1957; (Art. 13, Cap. III, Acuerdo Ministerial 008-2009, Ley 291).



Además se trata de una bacteria intracelular donde los fallos del mismo no se deben al desarrollo de resistencia al antibiótico sino a la incapacidad de penetrar la barrera celular.

(7, 18, 4, 19)

Control y profilaxis

Medidas higiénicas

Aislamiento y el sacrificio de los animales infectados, destrucción de los fetos abortados, placenta, excreciones uterinas y desinfección de las instalaciones contaminadas. (7, 4, 19)

Es esencial aislar vacas enfermas en el momento del parto y de igual forma las demás vacas gestantes que llegan al hato, puesto que algunas vacas no dan reacciones positivas en el suero sanguíneo hasta después del parto o abortado. (7, 4, 19)

Cuando se detecten animales positivos se realizara una nueva toma de sangre a los animales restantes de la finca en un tiempo no menor de 30 días ni mayor a 60 después de efectuada la prueba anterior. (7, 4, 19)

Todos los animales positivos o sospechosos de la enfermedad deberán eliminarse de la explotación. (7, 4, 19)

No se deberá de introducir animales provenientes de lugares con casos positivos o que no estén bajo control.

Se deberá contar con áreas de recría, de crecimiento y desarrollo de becerras, provenientes de vacas libres de brucelosis y de otras enfermedades, asegurando el remplazo de la explotación con animales sanos. (7, 4, 19)



VII. MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio: Observacional de corte transversal.

El estudio se llevó a cabo en la región occidental de Nicaragua, se incluyen los departamentos de León y Chinandega.

Muestra

Para el estudio se utilizaron 60 muestras de suero, del Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la UNAN – León.

Unidad de análisis: Suero sanguíneo.

Operacionalización de las variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR
Rosa de Bengala	Ensayo diagnóstico serológico para brucelosis	Reactor No reactor
Rivanol	Ensayo diagnóstico serológico para brucelosis	Reactor No reactor
ELISA	Inmunoensayo enzimático ligado a una enzima	Reactor No reactor

Criterios de inclusión:

- Sueros provenientes de la región occidental.
- Sueros que no estuviesen hemolíticos.
- Sueros con menos de 1 año de almacenamiento.



- Sueros de bovinos.

Criterios de exclusión:

- Sueros hemolíticos.
- Sueros con más de 1 año de almacenamiento.
- Sueros de otras especies.

Procedimientos Laboratoriales:

Rosa de Bengala.

Es una prueba rápida de aglutinación en placa utilizada en el diagnóstico serológico (indirecto) de la Brucelosis, y se basa en la demostración de la presencia de anticuerpos aglutinantes anti-Brucella, dirigidos a lipopolisacáridos presentes en la pared de Brucella.

(10, 5,13)

La suspensión bacteriana y coloreada, es aglutinada por anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del paciente. Esta es una prueba sencilla de aglutinación puntual que utiliza antígeno coloreado con Rosa de Bengala y tamponado a bajo pH normalmente $3,65 \pm 0,05$. La sensibilidad es del 95-99% y la especificidad de 94.1%. El procedimiento se realizó de acuerdo al manual de la casa comercial.

Rivanol.

(Lactato 2-etoxi-6,9 Diamino-acridina) es un colorante derivado de la acridina y tiene la particularidad de precipitar a proteínas del suero de los bovinos. Mediante el uso de cantidades iguales de suero y una solución de Rivanol al 1%, queda un precipitado y un sobrenadante después de 30 minutos de incubación y centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos en este sobrenadante se detectan exclusivamente las IgG. Además debe emplearse un antígeno especialmente elaborado para esta prueba con un pH de 5.8-6.2, pues debe compensarse el efecto de la dilución de los anticuerpos. El procedimiento se realizó de acuerdo al manual de la casa comercial. (10, 5,13)



ELISA.

Es una técnica altamente sensible, específica y versátil, es una prueba rápida por la que un anticuerpo o antígeno se une a una enzima como medio para detectar una relación entre el anticuerpo y el antígeno. El uso de ELISA de competición puede ser de gran valor para el diagnóstico confirmatorio de la infección en animales, sirviendo esta para diferenciarlos de los anticuerpos post-vacunales. El procedimiento se realizó de acuerdo al manual de la casa comercial. (10, 5,13, 17,18)

Análisis de las variables/resultados:

Para la base de datos se utilizó el programa estadístico Excel 2014. Para la estimación

de la sensibilidad se utilizó la fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Dónde VP, son los verdaderos positivos y FN, son los falsos negativos.

Para la estimación de la especificidad, se utilizó la fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Dónde VN, son los verdaderos negativos y FP, son los falsos positivos.



VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. De las 60 muestra analizadas en laboratorio, 50/60 (83.33%) resultaron rectoras a Rosa de Bengala, a continuación se presenta la tabla de contingencia donde se contrastan los resultados con el estándar de oro (Rivanol). El criterio para decir que una muestra es verdaderamente rectora tiene que ser reactor a los dos ensayos diagnóstico.

Tabla N° 1. Rosa de Bengala Vs Rivanol.

		Rivanol		Total
		Reactor	No reactor	
Rosa de Bengala	Reactor	38	12	50
	No reactor	2	8	10
Total		40	20	60

A partir de los resultados encontrados podemos decir que la sensibilidad y la especificidad de la prueba de Rosa de Bengala es de 95.0% (IC 83.5 - 98.6%) y 40% (IC 21.9 – 61.3%), respectivamente. Las muestras testadas proceden de campo, lo cual implica que no son muestras certificadas; esto pudo influenciar el resultado de la especificidad, así mismo hay que tener en cuenta detalles como el almacenamiento, y manejo de las muestras.

El valor predictivo positivo calculado fue de 76% (IC 62.66 - 85.7) y el valor predictivo negativo de 80% (IC 49 – 94.3%), esto es debido a que la especificidad fue muy baja, esto hace que el valor predictivo negativo sea alto dado que el tamaño de la muestra es pequeño y el estudio se realizó en una zona endémica.

Nuestros resultados no son coincidentes con el estudio realizado por Moussa Sanogo en Costa de Marfil; ya que el ensayo de Rosa de Bengala presento una baja sensibilidad y alta especificidad, mientras que nuestro ensayo fue exactamente contrario. Esto se debe a que los estudios varían mucho en cuanto a la cantidad de muestras en estudio, Moussa (995) y nuestro estudio se utilizaron un total de 60 muestras.



2. De las 60 muestra analizadas en laboratorio, 42/60 (70%) resultaron rectoras a ELISA, a continuación se presenta la tabla de contingencia donde se contrastan los resultados con el estándar de oro para Nicaragua.

Tabla N° 2 ELISA Vs Rivanol.

		Rivanol		Total
		Reactor	No reactor	
ELISA	Reactor	38	4	42
	No reactor	2	16	18
Total		40	20	60

A partir de los resultados encontrados podemos decir que la sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA es de 95% (IC 83.5 - 98.6%) y 80% (IC 58.4 – 91.9%), respectivamente. Las variaciones pueden deberse al estado sanitario de los animales, a procesos infecciosos agudos o crónicos que puede influenciar el resultado de la prueba (ELISA), debido a que el ELISA captura las inmunoglobulinas IgG₁, IgG₂, y Rivanol. IgG.

El valor predictivo positivo calculado fue de 90.5 (IC 77.9 – 96.2%) y un valor predictivo negativo de 88.9% (IC 67.2 – 96.9%), esto se debe a que el ensayo ELISA detecta inmunoglobulinas específicas haciendo más estrecho el margen de error. También la especificidad en este aumentó y por consiguiente el valor predictivo positivo es mayor que el valor predictivo negativo verificando una mayor efectividad de este ensayo.

Nuestros resultados son coincidentes con Wang S¹y Moussa Sanogo, ya que sus ensayos presentaron resultados muy parecidos de 94.8% y 96.1 el otro pero también coincidieron en presentar una especificidad más baja que la sensibilidad. Shamim Ahasan no presenta resultados coincidentes con los nuestros, porque la sensibilidad de Shamim es baja y la especificidad es alta (98.8%), y A. Praud también no coincidió al presentar una sensibilidad de 98.4%y una especificidad baja. Esto se debe a que los estudios varían mucho en cuanto a la cantidad de muestras en estudio, aunque como podemos ver con otros estudios no fue significativa la diferencia.



IX. CONCLUSIONES.

- Al haber evaluado los ensayos diagnósticos frente a brucelosis determinamos que la efectividad de la prueba ELISA es significativamente mayor que la prueba de tamizaje (Rosa de Bengala).
- La sensibilidad encontrada para ELISA al haberse contrastado con Rivanol fue de 95% al igual que Rosa de Bengala y con especificidades diferentes 80% para ELISA y 40% RB.
- El valor predictivo positivo de la técnica de ELISA fue 90.5% con un valor predictivo negativo de 88.9%.
- Para Rosa de Bengala el valor predictivo positivo fue de 76% y el valor predictivo negativo de 80%.



X. RECOMENDACIONES.

A propietarios.

- Comprar ganado bovino en fincas oficialmente libre de brucelosis.
- Evitar que animales no bovinos compartan el mismo espacio con el ganado vacuno.
- El agua de consumo debe ser exclusiva para los animales de la finca.
- Realizar en tiempo y forma las pruebas diagnósticas recomendadas por la ley.
- Utilizar pruebas específicas de confirmación (Rivanol y EILISA), para evitar pérdidas económicas tanto al productor como al país.
- Realizar de chequeos médicos al personal de la finca y propietarios.



Recomendaciones para futuras investigaciones.

- Sugerir a las autoridades IPSA, llevar un plan de vigilancia epidemiológica de *Brucella* en el personal de laboratorios, docentes y estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria.
- Aumentar el tamaño de muestra.
- Obtener sueros controles certificados por el organismo regulador (oie)
- Evaluar los ensayos con banco de suero y sueros frescos.



XI. BIBLIOGRAFÍAS.

1. Almeida Filho N, Castiel LD, Ayres JRM. Riesgo: concepto básico de la epidemiología. Salud Colectiva.2009; 5(3):323-344. (Disponible en: www.unla.edu.ar)
2. Collage of Veterinary Medicine Iowa StateUnivercity and Institutefor International Cooperation In Animal Biologics. Brucelosis. The Center for Food Security &Public Health. Julio de 2009.
3. Castro, González, María Inés (2005) Prat. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica. Clínica. Latinoamericana. v.39 n.2.
4. D.V.M Biberstein L. Ernest y ZEE. CHUEG YUAN. 1990. 1era edición. Tratado de Microbiología Veterinaria. Traducido por Ramis V. Manuel. Editorial ASCRIBIA, S.A. ZARAGOZA ESPAÑA. Capítulo 35.
5. López Alberto, Salgado Welmar, Seroprevalencia de brucelosis en bovinos y porcinos faenados en el rastro municipal de la ciudad de León utilizando la técnica Rosa de Bengala en el periodo comprendido Octubre-Diciembre 2012.
6. Lugo. 2011. Contribución al estudio epidemiológico de la brucelosis bovina en la Comunidad Autónoma de Galicia: investigación y aplicabilidad de las nuevas técnicas diagnósticas. Universidad de de Santiago de Compostela. España. 229p.
7. MAG-FOR. 2009. Ministerio Agropecuario y forestal. Acuerdo Ministerial N° 008-2009. Medidas Sanitarias para el control y erradicación de la Brucelosis Bovina en Nicaragua. Diario oficial. La Gaceta. N°120. 28P.



8. Md. Shamim Ahasan^{1, 2, 3} & Md. Siddiqur Rahman⁴ & A. K. M. Anisur Rahman⁴ & Dirk Berkvens¹. 2016. Bovine and Caprine Brucellosis in Bangladesh: Bayesian evaluation of four serological tests, true prevalence, and associated risk factors in household animals. Vol.
9. Moussa Sanogo ^{a,b,c}, Eric Thys ^{b,†}, Yaba L. Achi ^a, David Fretin ^d, Patrick Michel ^d, Emmanuel Abatih ^b, Dirk Berkvens ^b, Claude Saegerman ^c. 2012. Bayesian estimation of the true prevalence, sensitivity and specificity of the Rose Bengal and indirect ELISA tests in the diagnosis of bovine brucellosis. Vol.
10. Ortez M; Romero M.Y; 2012. Análisis cualitativo de los factores de riesgo de tuberculosis y brucelosis bovina en doce fincas lecheras certificadas libres de enfermedad, en los municipios de Matagalpa, San Ramón y Tuma – La Dalia departamento de Matagalpa.
11. Praud A, Durán-Ferrer M, Fretin D, Jaý M, O'Connor M, Stournara A, Tittarelli M, Travassos Dias I, Garin-Bastuji B. 2016. Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarisation assay for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Journal. Vol. 216:38-44.
12. Rodostits, O.M, Gay, C.C, Blood, P.C, .Hinchdiff, K.W. (2002) Medicina Veterinaria, (9na edición, vol. 1).
13. Rojas S. C; Tercero M. G; Noviembre 2014- enero 2015. Seroprevalencia de brucelosis en bovinos faenados en el rastro municipal de Chichigalpa y caninos de la zona aledaña, utilizando la técnica rosa de bengala como método de diagnóstico.
14. Samartino L., 2003. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina. INTA. Argentina.



15. Segura Luque Juan Carlos. 27/6/2005 Guías clínicas 2005; 5 (24) Fisterra.com Disponible en: <http://www.fisterra.com/guias2/brucelosis.asp>
16. Serikawa, T., Kondo, Y. Muraguchi, T., Yamada, J. Multiplicación de *Brucella canis* en órganos reproductivos y detección en auto anticuerpo en los espermatozoides. Pág. 73, 1983.
17. Tizard. R. 1998. Inmunología veterinaria. 5ta Edición. Traducido por la Dra. Araiza M. en español, editores McGRAW-HILL interamericana S. A. Publicado en México.
18. Tizard. R. 2002. Inmunología veterinaria. 6ta Edición. Traducido por Palacio M. R en español, editores McGRAW-HILL interamericana.S.A. Publicado en México.
19. Vadillo S, Duran. P. S y Mateo E. 2002. Manual de microbiología Veterinaria. Editores McGRAW-HILL/interamericana de España, S.A.U. primera edición 2013.cap. 19.
20. Wang S¹, Liu X, Rong R, Zhao H, Zhao C, Pu D, Zhao N, Jiang H, Tian G, Wang G, Cui B. 2016. Comparative analysis five kinds of serological detection methods about *Brucella*. Vol. 50(2):175-8.



ANEXOS.



