



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**USO DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO EN
MUESTRAS COMPUESTAS DE SUERO PARA LA VIGILANCIA DE BRUCELOSIS
BOVINA**

por

BARUCH MONZA, Joaquín

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 los Alimentos de Origen Animal.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

Dr. José Piaggio

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Andrés Gil.

Tercer miembro:

Dra. María Laura Sorondo

Fecha:

14 de Diciembre 2016

Autor:

Joaquín Baruch Monza

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Veterinaria, en especial a la Cátedra de Bioestadística que me ha acompañado en estos últimos 4 años de la carrera. A los Doctores Andrés Gil y José Piaggio por su constante colaboración tanto en esta tesis así como durante los estudios; apoyándome siempre en los proyectos a realizar, formándome como futuro profesional y como persona.

Al Departamento de Bacteriología de la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” por su colaboración en la capacitación y por proporcionarme las muestras. En especial a la Doctora Alejandra Suanes por su asesoría y por formarme de manera óptima en las técnicas diagnósticas.

A Julio Olascoaga que comenzó esta tesis conmigo y por otras razones no pudo acompañarme hasta el final. Habiendo colaborado igual con la gestión de la idea y la capacitación.

Por último agradezco a mi familia que me acompañó durante todo este proceso, a mis amigos y compañeros de estudio por el apoyo que me brindaron a lo largo de la carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pagina
PAGINA DE APROBACION.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGIA.....	15
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	21

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Pagina
Cuadro I: Casos anuales de Brucelosis en humanos por millón de personas.....	8
Cuadro II: Estimación de sensibilidades y especificidades para las siguientes pruebas diagnósticas.....	14
Cuadro III: Tabla de sensibilidades analíticas para la prueba de ELISA Indirecto por dilución.....	18
Figura I: Curva de sensibilidades analíticas para la prueba de ELISA Indirecto por dilución.....	18

RESUMEN

La Brucelosis Bovina (BrB) es una enfermedad infecciosa de larga data en el Uruguay, mundialmente distribuida e importante económicamente por fallas en la reproducción y descarte de animales con pérdida de material genético. Esta enfermedad se encuentra desde hace muchos años bajo programa sanitario. Para la misma se realizan pruebas individuales en suero y análisis en muestras compuestas "pool" para leche. Un cambio de estrategia en la vigilancia, considerando la baja prevalencia de la enfermedad entre rodeos (cerca al 1%), podría significar en un aumento en el número de muestras a analizar y una disminución en el costo de las mismas. Para ello se planteó la utilización de muestras en pool para la detección de BrB a través de un kit de ELISA indirecto. Tomando 62 muestras de suero positivas a ambas pruebas presuntiva y confirmatoria, se las diluyó con muestras negativas de predios que no presentaban casos de BrB. Para determinar la sensibilidad analítica de la prueba en pool se realizaron diluciones en base 2 hasta 1/1024. Los resultados fueron analizados por un modelo Probit con el software STATA 12. Resultados, La media de sensibilidad analítica para las diluciones fue: 1/4 (98.2%), 1/8 (96.8%), 1/16 (94.4%) y 1/32 (90.9%), si el suero positivo es diluido a mayores proporciones la sensibilidad analítica cae notoriamente. Conclusión, esta herramienta podría ser utilizada para la vigilancia de predios que se encuentran libres de la enfermedad y muestreos de plantas de faena. Actualmente se realizan cerca de dos millones de pruebas individuales, siendo la mayoría para la vigilancia. La combinación de la baja prevalencia entre predios, la gran cantidad de muestras analizadas anualmente y la utilización de pools de muestras pueden reducir significativamente el costo de la campaña sanitaria referente al diagnóstico, sin perder sensibilidad en el sistema.

SUMMARY:

Bovine Brucellosis is an infectious worldwide disease with a long history in Uruguay. It has a significant economic impact due to failure in the reproduction and slaughter of animals with a loss of genetic material. This disease is currently under a national eradication campaign. In order to eradicate the disease, several tests are carried out in serum and analysis in "pool" compound samples for milk. A change in monitoring strategy, taking as an advantage the low prevalence among farms (around 0.8%) could contribute to an increase in the number of samples being analyzed as well as a decrease in their cost. In order to achieve this, an ELISA indirect test for serum pools was carried out. Dilutions in a 2 base system were performed up to 1/1024. 62 positive samples (to both presumptive and confirmatory test) were diluted with negative sera from animals that did not belong to farms with positive animals. The results were analyzed by a Probit model in a STATA 12 software. Results: the mean of the analytic sensitivity for the dilutions are 1/4 (98.2%), 1/8 (96.8%), 1/16 (94.4%) and 1/32 (90.9%), if the serum is diluted to greater proportions the analytic sensitivity decreases. To conclude, this tool could be used as a monitoring test for farms free of the disease and slaughterhouse sampling. Currently, near two million individual samples are tested. Considering the low prevalence between farms, the large number of samples analyzed annually and the use of sample pools; the cost of the diagnostic health campaign can be reduced without losing sensitivity in the system.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES:

La Brucelosis fue aislada por primera vez en cabras por David Bruce en 1884 en la isla de Malta y en 1895 Bernhard Bang describió la enfermedad causada por *Brucella abortus* en bovinos. Esta enfermedad es causada por una bacteria intracelular facultativa con predilección por el sistema retículo-endotelial y órganos reproductivos. Ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como de riesgo III en el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Este microorganismo causa en humanos una enfermedad febril denominada Fiebre Ondulante, también conocida como Fiebre de Malta o Enfermedad de Bang.

Actualmente es la zoonosis más difundida a nivel mundial con más de 500.000 nuevos casos en humanos cada año. La transmisión ocurre a través de consumos de leche sin pasteurizar (también sub productos) o contacto directo con animales infectados. Este contacto se puede dar por abrasiones en la piel o membranas mucosas. El material placentario resultante de un aborto presenta alto riesgo así como la realización de tacto rectal sin guantes. En humanos la sintomatología clínica es muy variada, la enfermedad se caracteriza por un cuadro febril ondulante (lo cual puede dificultar su diagnóstico y en ciertos países ser confundido fácilmente con malaria o dengue)(Gil A. y Col. 2013. Pappas G.y Col. 2006. McDermott J. y Col. 2013)

Entre los países con mayor incidencia en humanos se encuentran, Siria, Iraq, Irán, Mongolia entre otros, estas incidencias son presentadas en el Cuadro I con la de Argentina como referencia. (Pappas G.y Col. 2006.)

Cuadro I: Casos anuales de Brucelosis en humanos por millón de personas:

País	Casos anuales/millón de personas
Macedonia	148
Iraq	278,4
Irán	238,6
Kazakstán	115,8
Kyrgyztan	362,2
Mongolia	605,9
Siria	1603,4
Tayikistán	211,9
Turquía	262,2
Argentina	8,4

Fuente: Pappas G. 2006.

Cabe destacar el periodo de incubación dura de 10-20 días. Dentro de los signos clínicos, más allá de la fiebre, presenta una etapa aguda con un gran cuadro febril, escalofríos y dolores musculares, sintomatología muy fácilmente atribuida a otras enfermedades. Por otro lado una etapa más avanzada aparecen los característicos síntomas de inflamación articular y orquitis (la cual puede llevar a esterilidad en el hombre). El tratamiento de elección es la Rifampicina, antibiótico bactericida del grupo de las rifamicinas, por su acción intracelular. En humanos, esta enfermedad presenta una sub notificación muy alta, lo que puede atribuirse a que se confunde

con otras enfermedades, así como a la falta de diagnóstico de laboratorio certero y confiable, como ocurre en ciertos países. Económicamente es considerada como una de las zoonosis con mayor impacto económico global. (McDermott J.y Col. 2013, Castro H. A.y Col. 2005)

Existen diferentes sub especies del genero brucella, pudiendo destacarse 10. Las clásicas 6 son: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Sin embargo se han encontrado 4 especies más de esta bacteria Gram negativa: *B. Ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. inopinata* y *B. microti*. (Getachew T.y Col. 2016, Vidya L.y Col. 2011)

En algunos países, la existencia de ciertos reservorios en animales salvajes, ha dificultado la erradicación total de la enfermedad, tal es el caso, del bisonte y el alce en América del Norte. (McDermott J. y Col. 2013)

En este trabajo nos centraremos en la Brucelosis Bovina, en los bovinos la misma se caracteriza por abortos en hembras, con retención de placenta, causando de esta manera una disminución y pérdidas en la producción. A nivel lechero la vaca enferma no producirá leche y a nivel de carne, perdemos un ternero. También se han descrito problemas de mastitis por vía descendente, así como, artritis, ya que ocasionalmente la bacteria se instala en las articulaciones. (Gil A. y Col. 2013.)

Según McDermott J. 2013 en países de altos ingresos económicos, se reporta que las vacas que abortan muestran una disminución en la producción láctea del 20-25% durante esa temporada. Por otro lado, vacas con seropositividad y no abortivas, pierden un 10% de su potencial productor. Todo esto toma relevancia en un país como Uruguay, donde la producción lechera tiene un papel muy importante a nivel económico y socio- cultural .Sin embargo, existe evidencia de que luego del primer aborto, se genera cierta resistencia debida a una respuesta inmunitaria, a pesar de ello, en nuestro país, los animales positivos deben ser sacrificados.

A finales del siglo pasado, se estimaba que en Argentina las pérdidas económicas por esta enfermedad, eran de U\$S 60.000.000 anuales, correspondiendo a U\$S1,2 por bovino, con una prevalencia de 5%. Por otro lado, en países de bajos ingresos como Nigeria, las pérdidas económicas se estimaban en U\$S 575.000, con un costo

de U\$S 3,16 por bovino, con una prevalencia de 7% a 12%. (Samartino L. E. 2002. McDermott J. y Col. 2013)

Sin embargo, la brucelosis ha sido eliminada satisfactoriamente en ciertos países como, Nueva Zelanda, República Checa, y Reino Unido. Estados Unidos se encuentra en la misma situación, pero como se ha mencionado anteriormente, con problemas de reservorio en Bisontes. Generalmente la enfermedad ha podido ser erradicada en países de alto o medio nivel económico. Esto resulta en beneficios económicos, sobre todo, en la disminución del gasto en el control de la enfermedad. El patrón general de erradicación, se basa en el diagnóstico y sacrificio de aquellos animales positivos, e inicialmente, también se utiliza la vacunación para disminuir la prevalencia, como es el caso de Uruguay. (Piaggio J.y Col. 2016, McDermott J.y Col. 2013)

Generalmente, en los diferentes países, las últimas etapas de la erradicación, han sido difíciles. Esto se atribuye a la combinación de altos costos por diagnóstico positivo, así como, a la dificultad de eliminación de reservorios en vida salvaje. Uruguay presenta una ventaja en este aspecto, generalmente los países que no les es viable la erradicación, cuentan con un servicio veterinario débil, que no es el caso de Uruguay con una campaña activa en esta enfermedad y un sistema de trazabilidad, que también beneficia a los sistemas de vigilancia basada en riesgo. (McDermott J. y Col. 2013)

En Latinoamérica, la enfermedad está presente en todos los países, algunos como México y Perú, con prevalencias muy altas, y otros, como el caso de Uruguay, con prevalencia baja, pero aún con la ocurrencia de focos de la enfermedad (Gil A. y Col. 2000; Gil A. y Col. 2002; Gil A. 2003; Gil A y Col. 2003; Repiso M.V. y Col. 2003).

En la legislación nacional, la BrB ya está nombrada en la lista original de las enfermedades de la ley 3.606 del 13 de abril de 1910 de todas las especies. Es de denuncia obligatoria para productores o encargados de animales y veterinarios tanto la sospecha como la presencia de la enfermedad. Uruguay pasó de un plan de control a un Plan Nacional de Erradicación de la Brucelosis Bovina en el año 1998. Este plan implicaba la suspensión de la vacunación obligatoria con cepa 19, el refuerzo de las actividades de vigilancia, la eliminación de los reactores y el

saneamiento de los predios con animales positivos. Las actividades de vigilancia en los establecimientos lecheros se realizaron a través de la prueba presuntiva colectiva de Anillo en Leche (PAL) sobre las muestras compuestas de leche extraídas de los tanques. Un PAL positivo llevaba a la realización de serología mediante la prueba presuntiva individual de Rosa de Bengala en el establecimiento. El PAL fue sustituido actualmente por la prueba de ELISA indirecto en leche, por su mayor sensibilidad. Las actividades de vigilancia epidemiológica de los establecimientos que producen animales para carne, estuvieron basadas en muestreos en plantas de faena, que se iniciaron a fines del año 2002. La cabaña nacional se monitorea mediante la exigencia de resultados serológicos negativos para el ingreso a exposiciones, remates ferias, liquidaciones y exportaciones. Los animales que provienen de una seccional policial declarada de riesgo, deben tener serología negativa previa al movimiento. (Gil A. y Col. 2013: Resolución 58/2014 DGSG-MGAP)

La marcha de esta campaña mostró su primer alerta a partir del año 2002, cuando a partir de dos focos iniciales y mediante muestreos serológicos realizados por la División Sanidad Animal sobre sus linderos, se detectaron 104 establecimientos positivos en ganadería de carne en el departamento de Rocha. (Gil A. y Col. 2013)

En este departamento, se aplicó la cuarentena (interdicción) con obligatoriedad de serología negativa previa al movimiento de los ganados susceptibles, en cinco seccionales policiales. A mediados del 2003, también surgió una situación de preocupación en el departamento de San José, donde existía un número importante de focos en establecimientos lecheros, lo cual se agravó durante el año 2005, al detectarse como positivo un campo de recría. A esta situación sanitaria, se agregó el incremento del diagnóstico de algunos casos de Brucelosis en humanos de áreas rurales del departamento de Rocha. Esta situación determinó, como está establecido, la transmisión de información entre los servicios locales y centrales del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca y el Ministerio de Salud Pública, para tomar las medidas que correspondían en forma coordinada. Estos casos alertaron sobre el riesgo que presupone esta zoonosis para los individuos que deben estar en contacto con los animales o sus productos. (Gil A. y Col. 2013)

Luego de 2005, se generaron ciertos cambios, dentro de estos es importante destacar: la vacunación con RB51 en el departamento de San José y la obligatoriedad de realizar serología en todos los establecimientos lecheros para la refrendación anual. (Gil A. y Col. 2013)

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 tres años y que todo animal positivo haya sido sacrificado. En función de esta normativa, una posible estrategia, sería declarar al país libre de brucelosis, 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 liberen 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.

Inicialmente la vigilancia de los establecimientos lecheros se basó en el PAL (recientemente sustituido por ELISA en leche tanque) con frecuencia trimestral y para todo el ganado vacuno, serología, teniendo como prueba presuntiva la de Rosa de Bengala (RB) y como confirmatoria, la prueba de Rivanol, Polarización Fluorescente (FPA) o Fijación del Complemento (FC). Los animales con serología positiva son identificados con marca de fuego por un veterinario oficial y el sacrificio obligatorio de animales con serología positiva, en un plazo de 30 días a partir de la fecha del diagnóstico. (Gil A. y Col. 2013)

La vigilancia en ganado de carne continua siendo en la faena, y la vacunación está limitada a los predios que la División de Sanidad Animal (DSA) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) considere que es necesario. (Decreto 20/998)

Una vez detectada la infección en un rodeo, siendo el establecimiento declarado como foco por parte de la DSA, se procede a las siguientes medidas: prohibición de todo movimiento con excepción de los que son enviados a faena. Todos los sitios epidemiológicamente relacionados (usando el sistema de trazabilidad) son investigados y todas las hembras son vacunadas en el foco y los linderos. A partir de ese momento, comienzan rondas de serología y eliminación de los reactores hasta

que dos rondas de diagnóstico dan negativo, con un mínimo de 4 meses de intervalo. Recuperando la calidad de predio libre. (Piaggio J. y Col. 2016)

En Uruguay, debido a los focos ocurridos en establecimientos ganaderos durante los últimos años, la Brucelosis Bovina se encuentra en una fase de control avanzado. Se estima que la prevalencia de la enfermedad entre predios, ronda el 0,8% y en animales susceptibles el 0,2%. (Piaggio J. y Col. 2016; Gil A. y Col. 2016)

A nivel nacional también existe un estudio de impacto económico, el que fue utilizado para la realización y fundamentación de los seguros contra brucelosis. Este estudio indica el costo de las medidas sanitarias aplicadas en nuestro país para el saneamiento de focos. Se incluyeron los costos del sangrado, vacunación, diagnóstico y compensación a los productores por los animales faenados, tal lo que se indica en la legislación nacional. Esto se realizó asumiendo una serología aplicada cada 120 días a partir de un modelo de simulación estocástico. Los resultados indicaron que anualmente se gastarían US\$ 2.360.000 de promedio en las medidas sanitarias aplicadas a los focos. Considerando que existen 344 establecimientos bajo cuarentena. (Piaggio J. y Col. 2016)

Sobre las pruebas diagnósticas:

La prueba de ELISA se basa en la unión de un antígeno con un anticuerpo y la lectura con un lector de ELISA de la absorbancia de la colorimetría que la reacción proporciona, al agregarse otros componentes del kit. El ELISA indirecto, se basa en que todos los pocillos de la placa se encuentran sensibilizados con un lipopolisacárido(LPS) de *Brucella abortus*. Las muestras de sueros son diluidas e incubadas en los pocillos y cualquier anticuerpo específico que pueda existir en el suero va unirse al LPS, formando un complejo que permanecerá unido luego del lavado. (Purquier Institute)

Luego del lavado se agrega una peroxidasa conjugada anti rumiante IgG y se unirá al compuesto, también se incorpora el substrato que es el que da color a la reacción, siendo este el principio colorimétrico que la prueba utiliza. (Purquier Institute)

Se asume que la prueba de Rosa de Bengala tiene una sensibilidad de 95,2% y una especificidad de 98,5%, sin embargo, se reconoce que hay reportes en la literatura de sensibilidades mucho más bajas, estimadas en animales con aislamientos

positivos, y en función de la prevalencia aparente, la especificidad es más alta para nuestras condiciones. Una 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%. 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%.(Stemshorn B. y Col. 1985;Gall D. y Col. 2004; Nielsen K. y Col. 2002).

Por otro lado según Praud y Col (2016), estudiando las pruebas de FPA, ELISA Competitivo, y ELISA Indirecto y RB reportan las siguientes especificidades estimadas: 99.89 % con un Intervalo de confianza 95% (IC 95%) de 99.67-99.93% para la prueba de FPA. Un 99.37% IC 95% 99.13-99.61% para ELISA Competitivo. 99.89% IC 95% 99.79-99.99 para RB. Y un 99.82% IC 95% 99.70-99.95% para la prueba de ELISA Indirecto.

El estudio reporta las sensibilidades de las mismas pruebas con los siguientes resultados, FPA: 96.4% IC 94.4-98.5%. ELISA Competitivo: 98.4% IC 97.0-99.8%. RB: 97.7% IC 95.9-99.3% y para ELISA indirecto 95.7% IC 93.4-98.0%.

Todas estas pruebas presentan un escenario muy optimista en cuanto a las sensibilidades y especificidades. Sin embargo, se destaca que para una etapa de screening en vigilancia, se recomiendan las pruebas de ELISA Indirecto, FPA y RB. (Praud A.y Col. 2016)

Otra estimación de sensibilidades y especificidades a través de un método bayesiano es mostrada en la Cuadro II, la misma fue extraída de Getachew 2016. (GetachewT. y Col. 2016)

Cuadro II: Estimación de sensibilidades y especificidades para las siguientes pruebas diagnósticas:

Prueba	Sensibilidad	IC (95%)	Especificidad	IC (95%)
RB	89.6 %	79.9–95.8	84.5 %	68.0–94.8
ELISA-I	96.8 %	92.3–99.1	96.3 %	91.7–98.8
FC	94.0 %	87.8–97.5	88.5 %	81.0–93.8

IC= Intervalo de confianza; RB= Rosa Bengala; ELISA-I= ELISA Indirecto; FC= Fijación del Complemento.

Nota: Datos extraídos de Getachew T. y Col. 2016.

Actualmente para la realización de la prueba de Rosa de Bengala existen cerca de 170 laboratorios en el Uruguay, 127 de ellos están habilitados por la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) “Miguel C. Rubino” del MGAP. Estos se encargan de la vigilancia de predios y sus sangrados mientras que DILAVE realiza la vigilancia de los sueros de plantas de faena y todas las pruebas confirmatorias.

Estimando los costos de RB en Uruguay, y considerando que la prueba se realiza anualmente en 2.000.000 de sueros, alcanza valores de entre US\$ 1.3 y 2.20, por muestra.

Por otro lado la prueba de ELISA indirecto con un kit de uso comercial tendría un costo estimado de US\$ 3,5 por animal individual, un poco más alto que la prueba de RB. Como se puede ver mediante esta revisión bibliográfica, existen muy variados valores tanto de sensibilidad como de especificidad para estas pruebas. Sin embargo, la prueba de ELISA I, presenta una muy alta sensibilidad. Utilizando esta ventaja se plantea la dilución de los sueros y así optimizar los costos de los Kits, sin afectar sustancialmente la sensibilidad. En el kit utilizado en este estudio, se plantea la posibilidad de realizar pruebas con 10 sueros en pool.

En caso de que el pool realizado dé positivo, se deberá identificar cuál o cuáles de las muestras fueron los sueros positivos de dicho pool que dieron la positividad en la reacción. Dada la baja prevalencia de la enfermedad, es predecible encontrar muchos pools negativos sin necesidad de desglosarlos y así poder bajar significativamente los costos de la campaña. (Piaggio J. y Col. 2016; Gil A. y Col. 2016)

OBJETIVO GENERAL

Evaluación y validación de la prueba de ELISA indirecto en muestras compuestas de suero “pools” como herramienta para la vigilancia epidemiológica de Brucelosis bovina en Uruguay.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Determinar la sensibilidad analítica de la prueba de ELISA sobre pools de sueros.

METODOLOGÍA:

Obtención de muestras:

Se seleccionaron 62 sueros positivos, de establecimientos con presencia de la enfermedad empleando los criterios que el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), a través de la División de Sanidad Animal (DSA), considera para definir un establecimiento como positivo, "foco".

Los sueros positivos correspondieron a animales reaccionantes a la prueba presuntiva y a la confirmatoria. Dichos sueros fueron obtenidos para este trabajo, gracias a la colaboración del DILAVE.

Selección de establecimientos libres de BrB:

Se consideraron libres a los establecimientos que no poseían historia de presencia de la brucelosis bovina en los últimos 5 años y que hayan tenido una vigilancia para la enfermedad adecuada (serología y/o leche tanque). Los sueros fueron testados con la prueba presuntiva y reaccionaron negativamente. Estas muestras también fueron proporcionadas por DILAVE. La cantidad de sueros negativos fue la necesaria para realizar las diluciones.

Se realizaron pools de 1 suero positivo en base 2 hasta una dilución de 1 en 1024 y se analizaron mediante la prueba de ELISA indirecto del Instituto Pourquier. Con dichos resultados se determinó la sensibilidad analítica de la prueba para pools.

Estos procedimientos fueron siempre realizados por el mismo operador.

Para guardar los pools de sueros, se dividieron en alícuotas rotuladas que se colocaron en viales los que inmediatamente se congelaron en freezer comerciales para nuevas investigaciones con otras pruebas.

El participante de este estudio recibió entrenamiento en el Departamento de Bacteriología de DILAVE, para la aplicación de las pruebas, su evaluación y de las medidas de bioseguridad que se tomaron por tratarse de una zoonosis.

Análisis estadístico

Para las estimaciones se utilizó un nivel de confianza del 95%. Se determinó la sensibilidad analítica de esta prueba con un modelo de regresión Probit utilizando el software STATA 12.0. (Long J. S.1997)

RESULTADOS:

La media de sensibilidad analítica para las siguientes diluciones fue: 1/4 (98.2%), 1/8 (96.8%), 1/16 (94.4%) y 1/32 (90.9%), a medida que se diluye a mayores proporciones, la sensibilidad analítica decrece, esto se puede observar en la cuadro III y figura I.

Cuadro III: Tabla de sensibilidades analíticas para la prueba de ELISA Indirecto por dilución.

Dilución	Sensibilidad analítica
1	0.9958
2	0.9912
4	0.9828
8	0.9682
16	0.9447
32	0.9091
64	0.8589
128	0.7926
256	0.7107
512	0.6161
1024	0.5140

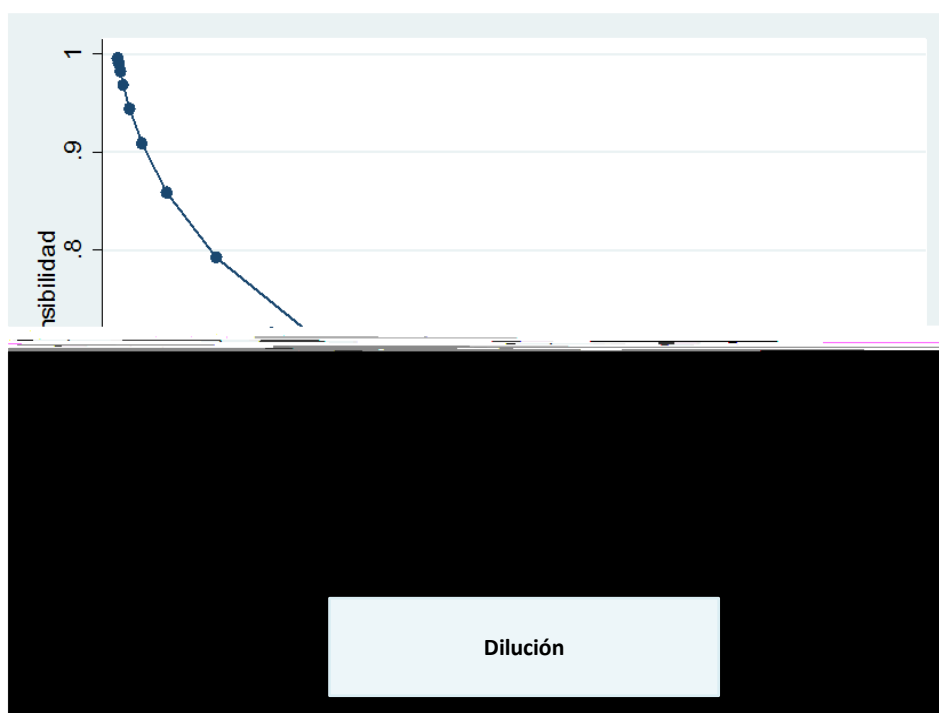


Figura I: Curva de sensibilidades analíticas para la prueba de ELISA Indirecto por dilución.

DISCUSIÓN:

El fabricante del Kit recomienda que se pueden realizar pools de hasta 10 sueros. Sin embargo, si consideramos como aceptable una sensibilidad relativa cercana al 95%, podríamos utilizarla y así disminuir los costos con un pool de 16 muestras. (Purquier Institute)

En enfermedades, como, HIV, Clamidia e infecciones por Hepatitis B en humanos, se ha demostrado que la utilización de pools, logra disminuir los costos en el diagnóstico, siendo esto posible, cuando se presentan escenarios de baja prevalencia. (Muñoz-Zannzi C.y Col. 2000)

También existen ejemplos en la medicina veterinaria, como la detección de *Salmonella enteritidis* en huevos o *Trichinella spiralis* en músculo de cerdos. El uso de pools con una técnica de PCR también ha sido utilizado para el diagnóstico de Diarrea Viral Bovina. También se puede utilizar esta técnica, para la estimación de la prevalencia de la enfermedad, a partir de la determinación de los positivos en los pools. (Muñoz-Zannzi C.y Col. 2000)

Para el caso de Brucelosis bovina actualmente se utilizan pools para la vigilancia del rodeo lechero, a partir de muestras de leche tanque. El uso de pruebas de alta sensibilidad, como el ELISA indirecto, ha sustituido al anteriormente utilizado PAL y podría también sustituir a la prueba de Rosa Bengala, donde la relación costo/beneficio, sea favorable. (Gil A.y Col. 2013)

CONCLUSIONES:

Mediante esta propuesta se buscó validar una herramienta diagnóstica para su implementación en escenarios de vigilancia epidemiológica, proporcionando a su vez una alternativa que tratará de disminuir el costo económico de la campaña sanitaria. Dicha herramienta podría ser utilizada por las autoridades sanitarias para predios de bajo riesgo o muestreos de faena, en los cuales importa detectar tropas con animales positivos, así como también, otras circunstancias que las autoridades consideren pertinentes.

En la perspectiva de rodeos con un 0.8 % de prevalencia, una prueba en pool puede ser útil, debido a que la probabilidad de que un pool resulte positivo en rodeos libres bajo vigilancia, o en muestreos de faena, es baja. Si consideramos los costos de un kit de ELISA indirecto, alrededor de US\$ 3 por muestra y lo dividimos entre el número de muestras del pool, su costo se reduce significativamente.

Con una campaña que analiza cerca de 2.000.000 de muestras por año, en una situación de 0.8% de prevalencia entre rodeos, se recomienda el uso de la prueba en pool para la vigilancia. Esto podría llevar a un mayor número de muestras analizadas anualmente y/o menores costos en el análisis de dichas muestras.

Como conclusión final, la utilización de muestras compuestas aparece como promisorias ya que la sensibilidad analítica muestra que no hay un gran efecto de dilución, pero previo a su implementación, debería evaluarse la posibilidad de que de alguna forma se pueda ver afectada la especificidad, por lo que se recomienda un estudio de campo, donde se realicen en paralelo, las pruebas tradicionales y las pruebas sobre muestras compuestas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Atluri, V. L., Xavier, M. N., De Jong, M. F., Den Hartigh, A. B., Tsolis, R. M. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual Review of Microbiology*, 65: 523-541.
2. Castro H. A., González S. R., Prat M. I. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta bioquím. clín. latinoam*, 39(2): 203-216.
3. Gall D.; Nielsen, K. (2004). Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Revista Científica Técnica, Oficina Internacional de Epizootias* 23:989-1002.
4. Getachew T., Getachew G., Sintayehu G., Getenet M., Fasil A. (2016). Bayesian Estimation of Sensitivity and Specificity of Rose Bengal, Complement Fixation, and Indirect ELISA Tests for the Diagnosis of Bovine Brucellosis in Ethiopia. *Veterinary Medicine International*. ID 8032753
5. Gil A. (2002). Manejo de los rodeos de cría de bovinos para carne en Uruguay. Seminario técnico Cría y Recría Ovina y Vacuna. INIA Serie Actividades de Difusión número 228. P. 71-80.
6. Gil A. (2003). Situación de la brucelosis bovina en la población ganadera del Uruguay. Jornadas Uruguayas de Buiatría, Uruguay, Paysandú. p. 56-59
7. Gil A., Samartino L., Otte J., Benkirane A. (2000). Principales zoonosis urbanas y periurbanas en la ganadería latinoamericana. XXI Congreso Mundial de Buiatría. Diciembre del 2000, *Punta del Este, Uruguay* Gil A., Silva M., Garín A., Caponi O., Chans L., Vitale E. (2003). Estudio transversal de la brucelosis bovina en el Uruguay. *International Symposium for Veterinary Epidemiology and Economics*. Viña del Mar, Chile. p.708
8. Gil, A.; Piaggio, J.; Lanfranco, B.; VonGehlen, A.; Fernandez, F. (2016) Classification of farm brucellosis status in function of the herd size, test characteristics, and cut-off used. *World Buiatrics Congress, Dublin Irlanda*. P. 380
9. Gil, A.D.; Piaggio J.; Suanes, A.; Nuñez, A.; Garin, A.; Silva, M.; Cesar, D.; Di Pace, B.; Mautone, G.; Zaffaroni, R.; Chans, M.N.; Huertas, S.M. (2013) Brucelosis bovina en Uruguay. En: Gil, A.D.; Piaggio, J.M. *Brucelosis bovina:*

- evaluación de las pruebas diagnósticas para muestras compuestas de leche y modelos epidemiológicos de difusión de la enfermedad. Montevideo, INIA, p 13-17.
10. Long J. S. (1997) *Regression model for categorical and limited dependent variables*. Southand Oaks, CA: Sage
 11. McDermott J., Grace D., Zinsstag J. (2013). Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Revista Científica Técnica, Oficina Internacional de Epizootias*, 32(1): 249-261.
 12. McMahan .K. (1944). *Brucellosis of cattle. Historical document*. Agricultural Experiment Station. Kansas State College of Agriculture and Applied Science Manhattan Kansas. Circular 222, p 1-16.
 13. Muñoz-Zanzi C. A., Johnson W. O., Thurmond M. C., Hietala S. K. (2000). Pooled-sample testing as a herd-screening tool for detection of bovine viral diarrhoea virus persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(3): 195-203.
 14. Nicoletti P. (2002). A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology* 90:5-9.
 15. Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology* 90:447-459.
 16. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 6 (2): 91-99.
 17. Piaggio J.; Lanfranco B; Rodriguez M.; Fernandez F.; Garin A.; Gil A; (2016). Annual cost of sanitation of farms with bovine brucellosis in Uruguay. *World Buiatrics Congress, Dublin, Irlanda*. P. 265.
 18. Praud A., Durán-Ferrer M., Fretin D., Jaý M., O'Connor M., Stournara A., Tittarelli M., Travassos Diaz I., Garin-Bastuji B. (2016). Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarisation assay for the diagnosis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, 216: 38-44.
 19. Purquier Institut: Serological Diagnosis of Brucellosis by ELISA Method, Disponible en: https://ca.idexx.com/pdf/en_ca/livestock-poultry/brucellosis-serum-test-insert.pdf Fecha de consulta, 9/11/16.
 20. Repiso M.V., Olivera M., Herrera B., Silva M., Guarino H., Núñez A., Osawa T., Fernández L., Bañales P., Gil A. (2002). Prevalencia de las enfermedades

que afectan la reproducción de los bovinos para carne en el Uruguay. Seminario técnico Cría y Recría Ovina y Vacuna. INIA Serie Actividades de Difusión número: 228. P. 57-70.

21. Samartino L. E. (2002). Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 90(1): 71-80.
22. Stemshorn B., Forbes, L., Eaglesome, M., Nielsen, K., Robertson, F., Samagh, B. (1985). A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis en Canada. *Can J Comp Med* 395-400.
23. Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Ganaderos. (2014) Dispónese que para la habilitación o refrendación de establecimientos que produzcan leche con destino comercial, se requerirá, para la detección de Brucelosis bovina, la prueba de ELISA realizada trimestralmente. Resolución 58/014 del 17 de marzo de 2014. Disponible en: http://www.ecolex.org/details/legislation/resolucion-no-58014-disponese-que-para-la-habilitacion-o-refrendacion-de-establecimientos-que-produzcan-leche-con-destino-comercial-se-requerira-para-la-deteccion-de-brucelosis-bovina-la-prueba-de-elisa-realizada-trimestralmente-lex-faoc132425/?subject=%2522Cultivated+plants%2522&locale=fr_FR&country_allWords=allWords&allFields_allWords=allWords&languageOfDocument=&languageOfDocument_allWords=allWords&searchDate_start=&country=&keyword=&tableId=1&basin_allWords=allWords&searchDate_end=®ion=&keyword_allWords=allWords&listingField=&screen=Common&page=621®ion_allWords=allWords&allFields=&basin=&sortField=score&subject_allWords=allWords Fecha de consulta 11/11/16