

Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la Brucelosis Bovina

Eva E. Ortiz Losada MSc, Eladio Silva Cabrera Dr. C., Maricela Izquierdo Marquéz MSc

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba

REDVET: 2007, Vol. VIII Nº 4

Recibido: 16.01.2007 / Referencia: 040712 / Aceptado: 30.01.2007 / Publicado: 01.04.2007

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030307.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n040407/040712.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

RESUMEN

El diagnóstico de la brucelosis bovina en los programas de control y erradicación de esta enfermedad se fundamenta en el pesquiasaje serológico mediante pruebas convencionales e inmunoensayos que identifican diferentes isotipos de anticuerpos. En este trabajo se realizó la normalización y evaluación de un método rápido para la detección de anticuerpos contra *Brucella* en suero bovino, basado en la tecnología ABICAP. En la normalización se determinaron las concentraciones óptimas del antígeno (22 µg/mL), el conjugado (4,7 µg/mL) y la dilución de los sueros controles (1:200) para conformar el sistema ABICAP-BRU. La sensibilidad analítica se estableció en la dilución 1:128. Se estimaron la Repetibilidad intra e interensayo con el empleo de 3 sueros (positivo alto, positivo débil y negativo) en 15 réplicas de cada uno en un mismo ensayo y en 15 ensayos diferentes, con la obtención de valores de absorbancia de los tres sueros entre $1,579 \pm 0,04$ y $0,139 \pm 0,002$ con un CV menor del 15

%. En la evaluación se investigaron 570 muestras de suero (213 sueros de animales infectados y 357 sueros de animales no infectados) y se determinaron los siguientes parámetros: el Valor de Corte (VC) en porcentaje de positividad (PP), la Sensibilidad y la Especificidad diagnósticas (Sd y Ed), los Valores Predictivos Positivos y Negativos (VPP y VPN), la Sensibilidad y la Especificidad relativas (Sr y Er), el índice kappa (κ) y la eficacia mediante el programa Win Episcopo 2.0 con un nivel de confianza del 95 %. El ABICAP-BRU presentó una Sd del 99,5 % y una Ed del 98,6 % en correspondencia con un VC de 30 PP. El VPP fue del 97,7 % y el VPN fue del 99,7 %. La Sr del ABICAP-BRU con las pruebas Rosa de Bengala (RB) y el ELISA DAVIH BRU2 fueron del 99,5 % y 97,7 %, respectivamente. La Er del sistema con RB fue de 98,6 % y de 98,5 % con el ELISA. El índice κ del ABICAP-BRU/RB fue de 0,98 y del ABICAP-BRU/ELISA fue de 0,96. El sistema mostró una eficacia del 98,9 %. Los resultados obtenidos permiten concluir que se logró la normalización y

evaluación del primer inmunoensayo rápido con la tecnología ABICAP para el diagnóstico junto al animal de la brucelosis bovina en nuestro país.

Palabras clave: brucelosis bovina | diagnóstico serológico | tecnología ABICAP |

SUMMARY

The diagnosis of bovine brucellosis for the control and eradication of this disease is supported on the serological screening using conventional serological tests and immunoassays which identify different antibody isotypes. This work presents data on the standardization and evaluation of a rapid method developed for the detection of anti-*Brucella* antibodies in bovine sera, based on the ABICAP technology. When standardization was performed, the optimum concentration of antigen (22µg/mL) and conjugate (4,7 µg/mL) was determined, as well as sera control dilution (1:200). The analytical sensitivity was established in the dilution 1:128. The intra-and inter-assay repeatability were estimated using three sera (high positive, weak positive, and a negative one). Each serum was tested on 15 replicates of each of them, in a single assay, and in 15 separate occasions. Absorbance values ranged from $1,579 \pm 0,04$ to $0,139 \pm 0,002$ and the coefficient of variation (CV) was less than 15 %. A total of 570 sera samples (213 from infected animals and 357 from non-infected ones) were

screened. The performance parameters were determined: the Cut-off value expressed as percentage of positivity (%P cut-off), the diagnostic sensitivity (D-Sn) and diagnostic specificity (D-Sp), the predictive positive and negative values (PP, PN), the relative sensitivity and specificity (Sn and Sp), the Kappa index (k); efficacy was measured by means of the Episcopo 2.0 Software, at 95 % accuracy level. The ABICAP-BRU system showed a D-Sn of 99.5 % and a D-Sp of 98.6 % in correspondence with a 30 %P cut-off value. The PP value was 97.7 % and the PN one was 99,7%. The relative Sn of the ABICAP-BRU system when applied with the Bengale Rose test (BR) and the DAVIH BRU2 ELISA was 99.5 % and 97,7 % respectively, while it showed a Sp value of 98,6 % with the Bengal Rose test, and 98,5 % with the ELISA. The k index ABICAP-BRU/Bengal Rose was 0.98 and the ABICAP-BRU/ELISA 0.96. The system showed an efficacy of 98,9 %. The results obtained allow us to conclude that the process of standardization and evaluation of the first rapid immunoassay based on the ABICAP technology for the diagnosis of bovine brucellosis under field conditions in our country was achieved.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa producida por bacterias del género *Brucella*. Estas bacterias afectan a varias especies de animales domésticos y de vida salvaje, además, se transmiten ocasionalmente al hombre. En la actualidad se considera entre las principales zoonosis de distribución mundial, debido a su gran impacto en la economía de los países y en la salud pública (Corbel, 1997; López, 2002).

En la industria pecuaria la brucelosis produce pérdidas económicas por abortos, muerte de terneros y disminución de la producción de leche, entre otros. Además, la presencia de esta zoonosis afecta el comercio internacional por la pérdida de los mercados. La enfermedad en el hombre provoca gastos en medicamentos, una disminución en el rendimiento físico e intelectual e incluso puede conllevar a la muerte (Chin y Ascher, 2001; Samartino, 2002).

En el continente americano algunos países como Canadá y Belice han logrado la erradicación de esta enfermedad por medio de programas de control y vacunación de los animales domésticos (Suárez, 2002).

En nuestro país, en 1964, se estableció el Programa para el Control y la Erradicación de la brucelosis. En un principio, con el propósito de disminuir la tasa de incidencia de esta enfermedad en la masa bovina, se realizó el sacrificio de todos los animales positivos por las pruebas serológicas y se procedió al saneamiento ambiental del área. A partir de 1980 se comenzaron a vacunar las hembras adultas con la dosis reducida de la vacuna de *Brucella abortus* cepa 19 para mejorar el estado epizootico de los rebaños y más adelante se extendió la vacunación a todas las hembras sin tener en cuenta su estado reproductivo (Cotrino y Fernández, 1991; Vera *et al.*, 1999; Seoane y Toledo, 2004).

En los últimos años el programa se ha perfeccionado con el estudio bacteriológico de los abortos y las placentas, de los animales procedentes de hatos libres en los que no está claro el origen del aborto y de esta forma se ha logrado el aislamiento de *B. abortus* biovar 1 y *B. suis* biovars 1 y 2 (Sánchez *et al.* 1989; Martín, 1997). La confirmación del diagnóstico bacteriológico por su elevada sensibilidad se realiza mediante la prueba biológica en curieles (Vera *et al.*, 1999; Martín y Peñate, 2004).

El pesquiasaje serológico tiene gran relevancia para el control de la brucelosis, debido a lo engorrosa que resultan las técnicas de aislamiento y cultivo de las bacterias y el riesgo que implica la manipulación de este tipo de material para el personal de laboratorio (OIE, 2004a).

Entre las técnicas que se emplean a nivel internacional con mayor frecuencia con este fin, se encuentran las pruebas convencionales: Aglutinación Lenta en Tubo (SAL), Rosa de Bengala (RB), Antígeno Tamponado de Placa (ATP), 2- mercaptoetanol (2-ME), Reacción de Fijación del Complemento (RFC), y los inmunoensayos: ELISA (Ensayos Inmunoabsorbentes vinculados a Enzimas) y el Ensayo de Polarización Fluorescente (EPF) (Paweska *et al.* 2002; McGiven *et al.* 2003; OIE, 2004a).

En los últimos años las organizaciones internacionales han encaminado el desarrollo de medios diagnósticos hacia la búsqueda de métodos sencillos y rápidos, que posibiliten su uso en los lugares más apartados y con peores condiciones de trabajo, para así vencer las dificultades que se presentan en la actualidad con la adquisición de equipos y reactivos. Esto se hace más evidente en el diagnóstico de la brucelosis porque desde hace mucho tiempo esta actividad ha estado regida por técnicas convencionales que requieren una engorrosa ejecución en algunos de los casos (Samartino, 2004).

En la actualidad el algoritmo para el diagnóstico serológico de la brucelosis en nuestro país se realiza con el empleo de las pruebas SAL y RB para el pesquiasaje de anticuerpos. Como pruebas complementarias se utilizan el 2-ME y el ELISA; y la confirmación de los resultados positivos por estas pruebas se realiza con la RFC (Vera *et al.*, 1999; Seoane y Toledo, 2004; Martín y Peñate, 2004).

En Laboratorios DAVIH se comercializa el inmunoensayo indirecto ELISA DAVIH BRU2 que se caracteriza por presentar una elevada sensibilidad y especificidad, su realización es sencilla, rápida, resulta económica y para su ejecución se requiere de un mínimo de instrumental de laboratorio (Argote *et al.* 1989; Argote y Rodríguez, 1995).

En el año 2000, la firma BIOGNOSIS; estableció colaboración con varias instituciones científicas cubanas para introducir la tecnología ABICAP para el diagnóstico de algunas enfermedades en el hombre y los animales. Teniendo en cuenta lo antes planteado y que

el ABICAP es un inmunoensayo versátil, que posibilita un diagnóstico rápido no solo en condiciones de laboratorio sino en el campo, nos propusimos la aplicación de la tecnología ABICAP para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina.

Objetivo general.

Desarrollar un ensayo para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, basado en la tecnología ABICAP.

Objetivos específicos.

1. Normalizar los componentes del sistema ABICAP para la detección de anticuerpos a *Brucella*.
2. Determinar el comportamiento de los parámetros de desempeño del sistema, mediante el empleo de muestras caracterizadas y patrones de comparación de referencia.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Etiología de la brucelosis.

2.1.1 Características del género *Brucella*

El género *Brucella* está constituido por coccobacilos o bacilos cortos gram negativos, pequeños que se disponen de forma aislada y con menor frecuencia en pares o en grupos pequeños, no móviles, no producen una verdadera cápsula, ni fimbrias, ni pilis y carecen de capacidad para sintetizar esporas. Para su crecimiento requieren una temperatura de 37 ° C y un pH óptimo entre 6,6 y 7,4. En su mayoría son aerobios estrictos, aunque algunas especies como *Brucella abortus* requieren de un 5 a un 10 % de CO₂ en su primer aislamiento. Son parásitos intracelulares facultativos que producen procesos crónicos en el huésped (Holt *et al.* 1994; Brooks *et al.*, 1998; Acha y Szyfres, 2003).

Con respecto a la taxonomía del género *Brucella* pertenecen al Reino de las Proteobacteria, que comprende la Clase Rodospirilla, el Orden Rizobial, la Familia Brucellaceae y el género *Brucella* (FAO, 2004).

2.1.2 Especies y biotipos del género *Brucella*

En la actualidad dentro del género *Brucella* se reconocen seis especies con diferentes biovars, así tenemos *Brucella melitensis* con 3 biovars (1, 2 y 3), *Brucella abortus* con 7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9), *Brucella suis* con 5 (1, 2, 3, 4, y 5), *Brucella canis*, *Brucella ovis* y *Brucella neotomae* con un biovar cada una. La última especie descrita de *Brucella* se aisló de mamíferos marinos, en las costas de diferentes continentes, con lo cual se amplía el rango ecológico del género y su alcance como zoonosis (Blank, 2002; OIE, 2004a; Samartino, 2004).

2.2 Composición antigénica:

En la membrana externa de *Brucella*, se encuentra el Lipopolisacárido (LPS) que es el componente más externo, abundante y antigénico. El LPS en las cepas lisas está constituido por tres elementos: El **lípidio A** contiene 2 tipos de amino-glucosa y ácidos grasos, excepto el ácido β hidroximurístico, el **polisacárido central** que contiene el ácido 2-ceto 3-dexioctónico fosfato (Kdo), glucosa, manosa y quinovosamina y la **cadena O polisacárido**: constituida por un homopolímero de alrededor de 100 unidades de 4-formamido-4,6-didesoximanosa denominado perosamina. La presencia de una cadena O semejante a la de *B. abortus* en algunas bacterias Gram negativas, es la causa de la actividad antigénica cruzada que se observa con: *Escherichia hermanni* y *Escherichia coli*

O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O:1 y *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel, 1985; Gerbier *et al.* 1997; Biancifioro, 1998; Godfroid *et al.* 2002).

La estructura del LPS de las cepas rugosas es básicamente similar al LPS de las cepas lisas, excepto por la cadena O, que está ausente o reducida a unos pocos residuos, por lo que la especificidad de este LPS está determinada por el polisacárido central (Nielsen, 2002).

Otros componentes antigénicos son las proteínas de membrana externa que se agrupan en: **proteínas mayores** [el grupo 1 (88 a 94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa, porinas) y grupo 3 (25-27 kDa)] y **proteínas menores** (las lipoproteínas de membrana externa) de acuerdo a su peso molecular. Dentro de las proteínas periplásmicas BP26, se encuentra el componente A2, que es una glicoproteína resistente al calor, empleada en el diagnóstico de la infección en bovinos (Morrión y López, 1998).

2.2.1 Respuesta Inmunológica:

Una vez que la brucela alcanza el medio intracelular, desarrolla estrategias para su supervivencia, como permanecer en el fagosoma intacto y bloquear la fusión posterior con el lisosoma, por la presencia de la cadena O y los lípidos de ornitina que interactúan directamente con la membrana del fagosoma y de esta forma se protege de la acción de los péptidos catiónicos y enzimas líticas presentes en los gránulos lisosómicos (Abbas *et al.*, 1991).

Paralelamente, las bacterias deben resistir los potentes intermediarios del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos), formados en los fagocitos durante la explosión respiratoria que acompaña a la fagocitosis para la destrucción de las bacterias ingeridas, por esta razón la superóxido dismutasa y la catalasa, enzimas presentes en *Brucella*, se integran en el mecanismo de defensa frente a la toxicidad oxidativa. Otra forma de evadir este mecanismo bactericida del huésped es la inhibición de la explosión respiratoria, o provocar una respuesta muy débil y de corta duración, esta estrategia es adoptada principalmente por *B. abortus* (Aréstegui, 2001).

En la infección por bacterias Gram negativas las células del huésped se exponen a dos antígenos diferentes el LPS y las proteínas de la pared celular, los que ejercen diferentes formas de activación del sistema inmune. Los antígenos proteicos se localizan en compartimentos intracelulares de las células presentadoras de antígeno (CPA), como los macrófagos, las células asesinas y las células dendríticas, los cuales son procesados a pequeños péptidos, que se asocian con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I ó II, ser presentados en la superficie de las CPA y reconocidos por los linfocitos T. El LPS es un antígeno T-independiente capaz de activar los linfocitos B (LB) para la producción de anticuerpos (Splitter *et al.*, 1996; Aréstegui, 2001).

La **inmunidad mediada por células** (IMC) es la responsable del control de la infección; la *B. abortus* es una fuerte inductora de la inmunidad celular tipo I por su capacidad para estimular la producción de interleucina-12 (IL-12) en macrófagos, por la interacción del LPS con el receptor CD14, la cual estimula a las CA y a los linfocitos T CD4+ (LTCD4+) a secretar más interferón gamma (IFN- δ). Los linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ activados por el IFN- δ , liberan las sustancias granzina y perforina, que facilitan la lisis de los macrófagos para que las bacterias queden libres y sean fagocitadas por macrófagos activados (Golding *et al.*, 2001; Aréstegui *et al.* 2001).

La **inmunidad humoral** se establece en el marco de la cooperación entre los LT CD4+ y los LB, los primeros producen el IFN- δ que estimulan a los LB a producir los isotipos IgG

(IgG1 e IgG2), activan el complemento (C) y favorecen la opsonización de las bacterias para su fagocitosis. (Golding *et al.*, 2001).

2.2.2 Inmunoglobulinas

En la brucelosis en el bovino se producen cuatro clases de inmunoglobulinas (IgM, IgG1, IgG2 e IgA). En los animales vacunados con la cepa 19 de *B. abortus*, las IgM aparecen primero, entre los 4 y 6 días de postvacunación y alcanzan los títulos máximos entre los 13 y 16 días, después su concentración disminuye, pero sin desaparecer durante varios meses o años. A continuación aparecen las IgG (entre los 5 y 10 días) y alcanzan títulos máximos entre los 28 y 42 días, sus títulos son más bajos que los de las IgM, descienden rápidamente y desaparecen en los animales jóvenes, pero pueden persistir en algunos adultos. En el animal infectado los dos tipos de anticuerpos aparecen de forma simultánea, pero los primeros en desaparecer son las IgM, mientras que las IgG (IgG1 e IgG2) alcanzan niveles más altos y aunque disminuyen, persisten durante la infección (Samartino, 2002). En las infecciones crónicas predominan las IgG2, en la leche de las vacas infectadas se encuentran estas inmunoglobulinas en concentraciones diferentes a las que se presentan en el suero, los títulos altos de las IgA en la leche son importantes para la prueba del anillo (Cotrina y Fernández, 1991).

2.3 Patogenia.

Las bacterias que penetran en el organismo y sobreviven a la primera barrera de defensa a nivel de las mucosas, alcanzan los ganglios linfáticos regionales y se incorporan al torrente sanguíneo entre los 10 y 21 días, este es el estadio bacteriémico que se identifica con la elevación de la temperatura corporal. Las brucelas utilizan el sistema linfático para su propagación y de esta forma colonizar los órganos y tejidos de su predilección como son los ganglios linfáticos, el útero, la placenta, los tejidos fetales, la ubre, los órganos genitales en el toro (epidídimo y las glándulas sexuales accesorias), bazo e hígado, en estos se producen alteraciones anatomopatológicas más o menos marcadas. Después del aborto o el parto normal la bacteria no permanece en el útero, la infección se vuelve crónica y las mismas se localizan en los ganglios, las glándulas mamarias y pueden permanecer en la ubre durante años (Cotrina y Fernández, 1991; Acha y Szyfres, 2003).

2.4 Epidemiología de la brucelosis.

La brucelosis es una de las zoonosis de mayor distribución a nivel mundial. Esta enfermedad es de gran importancia tanto en la salud pública como en la producción pecuaria, constituyendo una barrera para el comercio de animales y de los subproductos de origen animal, lo cual afecta la economía de los países que no han podido erradicar la misma (Corbel, 1997; Acha y Szyfres, 2003).

Cada especie del género presenta su huésped natural que a su vez actúa como reservorio de la infección. *Brucella melitensis* tiene como huéspedes preferenciales las cabras y ovejas, *Brucella abortus* el ganado bovino, *Brucella suis* el cerdo, el reno y la liebre, *Brucella canis* el perro, *Brucella ovis* las ovejas, *Brucella neotomae* las ratas del desierto (OIE, 2004b; Acha y Szyfres, 2003).

Con *B. abortus* se pueden infectar otras especies de animales domésticos (ovinos, cabras y perros) y animales silvestres (camellos, bisontes, alces, liebres, zorros, búfalos, yaks, antílopes entre otros). En estos últimos la brucelosis desaparece cuando la bacteria es erradicada en los animales domésticos (Al-Khalaf, 1989; OIE, 2004a).

2.4.1 Brucelosis bovina.

En el bovino, *B. abortus* es el agente etiológico de la enfermedad, que se conoce como brucelosis, enfermedad de Bang, aborto contagioso o aborto infeccioso. Los bovinos se pueden infectar por *B. melitensis*, cuando comparten el pastoreo o las instalaciones con cabras u ovejas infectadas. Es raro que *B. suis* que produzca la infección del ganado bovino, aunque esta especie ha sido aislada de las glándulas mamarias de las vacas (OIE, 2004a).

El signo predominante en las hembras preñadas e infectadas, es el aborto o el nacimiento prematuro o a término de terneros muertos o débiles. El aborto se presenta de forma espontánea, entre el quinto y el noveno mes de gestación, a veces con retención placentaria y en consecuencia, una metritis que puede ser causa de infertilidad permanente. En los casos en que no se presenta el aborto, la excreción del agente etiológico se puede producir a través de la placenta, los fluidos fetales y las descargas vaginales. Cuando la infección se localiza en la glándula mamaria o en los ganglios supramamarios, entonces las brucelas se eliminan en la leche de forma constante o intermitente (Acha y Szyfres, 2003). En las hembras no preñadas la enfermedad presenta un curso asintomático, pero los animales quedan infectados de por vida (OIE, 2004a).

En los toros las bacterias se localizan en los testículos y las glándulas accesorias y clínicamente pueden desarrollar orquitis y bursitis tersiana y carpiana, que pueden provocar infertilidad y retiro del servicio. Ocasionalmente, en los bovinos se observan higromas y artritis como una manifestación de brucelosis (Cotrina y Fernández, 1991; OIE, 2004a).

En el bovino la principal vía de transmisión de la infección es la **vía digestiva** por la costumbre de las vacas de lamer los fetos abortados, los terneros recién nacidos y los órganos genitales de otras vacas que contienen gran número de brucelas. También por la ingestión de pastos, forrajes y aguas contaminadas con el agente infeccioso (Acha y Szyfres, 2003; Samartino, 2004).

La **vía intrauterina** adquiere importancia si se realiza la inseminación artificial de las hembras con semen infectado. La transmisión por **vía respiratoria** es menos frecuente y tiene lugar, cuando se agrupan los animales, mediante la inhalación de polvo y partículas que transportan brucelas (Samartino, 2004).

Otra forma en que la bacteria puede penetrar al huésped es por la **conjuntiva ocular** y en el bovino también puede ocurrir la transmisión de la madre al ternero (Cotrina y Fernández, 1991; Acha y Szyfres, 2003).

El **período de incubación** es variable y difícil de precisar, puede ser de 5 a 7 días y a veces llegar a varios meses. En infecciones naturales cuando más adelantada está la preñez, más corto se hace el mismo (Acha y Szyfres, 2003).

2.5 Diagnóstico bacteriológico.

Para establecer un correcto diagnóstico de laboratorio, ante la sospecha de brucelosis, se toman en los animales vivos, muestras de sangre, de calostro, de leche, del flujo vaginal, de la placenta, de los cotiledones, de semen, líquidos de abscesos de higromas o bursitis y en el caso de epididimitis, de testículos y de epidídimos. En caso de material abortado se debe coleccionar el contenido estomacal, pulmón, bazo de los fetos abortados y membranas fetales. De los animales muertos se toman los ganglios linfáticos, hepáticos, mesentéricos, submaxilares, retrofaríngeos entre otros, bazo e hígado. Cuando se pretende el aislamiento de *Brucella sp.*, no se adicionan antibióticos a las muestras coleccionadas, las mismas se deben trasladar lo más rápido posible al laboratorio (antes de las 24 horas) refrigeradas o congeladas (Samartino, 2004; Montes, 2004).

El diagnóstico bacteriológico es un procedimiento laborioso, largo y costoso, que no se

utiliza como diagnóstico de rutina. En la brucelosis el aislamiento e identificación de las brucelas se realiza por:

- a. Observaciones microscópicas de extensiones o frotis.
- b. Cultivo en diferentes medios.
- c. La inoculación experimental en animales.

a) Las observaciones microscópicas se realizan por examen microscópico directo de frotis de tejidos o fluidos biológicos que previamente se fijan con calor o etanol. En la identificación de la morfología de las brucelas se utilizan la tinción de Gram o el método de Ziehl-Neelsen modificado por Stamp, pero con frecuencia toman pobremente la contratinción y son resistentes a la decoloración por ácidos débiles (OIE, 2004a).

b) Las brucelas al microscopio se observan como cocobacilos o bacilos cortos, gram negativos que miden de 0,6 a 1,5 μm de longitud y de 0,5 a 0,7 μm de ancho. En la interpretación de los resultados se debe establecer el diagnóstico diferencial con las especies de bacterias que presentan una morfología similar a *Brucella* (OIE, 2004a).

c) El aislamiento de *B. abortus* se realiza mediante diferentes medios de cultivo como son:

- ✓ Medio basal (medio basal de *Brucella*, agar soya triptosa o triptona, agar sangre, agar columbia, agar dextrosa suero, agar dextrosa glicerol y el medio Castañeda).
- ✓ Medios selectivos (medio Farrell y medio Thayer -Martin modificado)
- ✓ Medio de enriquecimiento (caldo dextrosa suero, caldo soya triptona y caldo *Brucella* (OIE, 2004a).

Una vez inoculados los medios de cultivo, las placas de agar se incuban a 37 °C en aerobiosis y atmósfera de 5 a 10 % de CO₂ hasta seis semanas con subcultivos semanales. En el primer-aislamiento las colonias son pequeñas, convexas, usualmente lisas, húmedas, de color miel y de 1 a 2 mm de diámetro (OIE, 2004a; Martín y Peñate, 2004).

Para comprobar la morfología de la colonia se emplean: el método de Henry, la prueba de acriflavina (las colonias lisas forman una suspensión uniforme) y la inundación con cristal violeta (las colonias lisas se observan de color amarillo pálido) (OIE, 2004a).

En la identificación de especie se realizan las pruebas del metabolismo oxidativo y las pruebas de susceptibilidad a bacteriófagos. Las brucelas por sus características bioquímicas son catalasa y generalmente oxidasa positivas, excepto *B. neotomae* y *B. ovis* que son oxidasa negativas. Hidrolizan la urea en extensión variable, reducen los nitratos a nitritos (excepto *B. ovis*), no utilizan el citrato, no producen Indol, son Rojo Metilo y Voges Proskauer negativas (Carter, 1994; Brooks *et al.*, 1998).

En la prueba de susceptibilidad a bacteriofágos sobre una capa de *Brucella* sembrada de forma masiva se coloca una gota de cada uno de los bacteriófagos: Weybribge (Wb), Firenze (Fz), Tbilisi (Tb) y Berkeley (Bk) y se observa la lisis en los lugares donde se colocaron las gotas (OIE, 2000b; López, 2002).

En el reconocimiento de las biovares se emplea el examen para crecimiento en presencia de fucsina básica y tionina, la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), requerimientos de dióxido de carbono, la producción de ureasa y la aglutinación con los antisueros específicos A y M. La aglutinación positiva con estos antisueros proporciona un diagnóstico presuntivo del aislamiento como *Brucella* (Brooks *et al.*, 1998; OIE, 2004a).

En la actualidad para el diagnóstico y la clasificación de este género se utilizan métodos de biología molecular como la determinación del polimorfismo de los Fragmentos Generados por Enzimas de Restricción, la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa y la electroforesis en campos pulsantes entre otras, que permiten identificar de forma precisa el agente involucrado y diferenciar la especie *B. abortus* de campo de la cepa vacunal (Martín, 1997; Leal *et al.*, 1999; Betsy *et al.*, 2000; Martín y Peñate, 2004).

c) La prueba biológica en curieles es un modelo altamente sensible, este se emplea cuando las muestras están muy contaminadas. Las mismas se inoculan por vía subcutánea, en ocasiones vía oral, a las tres semanas se sacrifica un animal y otro a las seis semanas. En el momento del sacrificio se toman muestras de sangre, se identifican las lesiones macroscópicas y se siembran muestras del bazo. Para esta prueba se pueden emplear ratones, los cuales se inoculan por vía intravenosa o subcutánea. A los siete días postinoculación se sacrifican y se siembran muestras del hígado y del bazo en un medio enriquecido (Vera *et al.*, 1999; Cotrina y Fernández, 1991).

2.6 Diagnóstico serológico.

En los programas de control y erradicación de la brucelosis cada país emplea una o dos pruebas serológicas en el pesquisaje de anticuerpos y los resultados positivos son confirmados por pruebas más específicas. Los ensayos usualmente se aplican a nivel de rebaño por lo que deben ser rápidos, económicos, de fácil realización y sin riesgos para el personal que los ejecuta (OIE, 2004a; Samartino, 2004a).

Las principales pruebas serológicas que se emplean en el diagnóstico de brucelosis bovina son las siguientes:

- I) Aglutinación Lenta en Tubo (SAL).
- II) Las pruebas de antígeno acidificado tamponado (la prueba RB y la ATP).
- III) 2- mercaptoetanol (2-ME).
- IV) Reacción de Fijación del Complemento (RFC).
- V) Ensayos Inmunoabsorbentes vinculados a Enzimas (ELISA).
- VI) Ensayo de Polarización Fluorescente (EPF).

I) **Aglutinación Lenta en Tubo (SAL).**

La SAL fue la primera prueba serológica creada para detectar la brucelosis y fue utilizada como método de diagnóstico en los programas de control y erradicación de la enfermedad (OIE, 2004a). Este ensayo es sencillo y fácil de implementar pero requiere de un equipamiento básico de laboratorio. Se caracteriza por presentar una baja sensibilidad para detectar animales infectados y reacciona fundamentalmente frente a las IgM por lo que puede ser utilizada para detectar infecciones agudas. En la actualidad no se recomienda su empleo en el diagnóstico de la brucelosis por su baja sensibilidad y especificidad (Nielsen, 2002; OIE, 2004a).

II) **Las pruebas de antígeno acidificado tamponado:**

Estas pruebas son utilizadas generalmente como pruebas de pesquisaje para la detección de anticuerpos contra *Brucella*; y su realización es sencilla y fácil de implementar (Nielsen, 2002; Samartino, 2004). Los antígenos se utilizan a un pH entre 3,65 y 4,0; que favorecen la aglutinación por IgG1 y reducen las interacciones inespecíficas. Estas pruebas no detectan los anticuerpos producidos por la vacunación con *B. abortus* cepa 19 y es necesario el empleo de otras pruebas para confirmar que los animales reactores están

infectados (González *et al.*, 1998; Nielsen, 2002; Samartino, 2004).

III) **La prueba 2-ME:** presenta una elevada especificidad en la detección de los anticuerpos anti-Brucella y complementa los resultados de las pruebas de pesquiasaje. Las desventajas de este ensayo son el tiempo requerido para su realización (48 horas) y la toxicidad del reactivo 2-ME (Cotrina y Fernández, 1991; Samartino, 2004).

IV) **Reacción de Fijación del Complemento (RFC).**

La prueba RFC es ampliamente utilizada como prueba confirmatoria, por su elevada especificidad. Existen dos variantes de la misma: la clásica o macrométodo y el micrométodo. En la realización de este ensayo se utilizan cuatro componentes (antígeno, complemento, hemolisina y hemáties lavados de carnero) que son normalizados para medir el suero problema y que hacen compleja su ejecución, además se necesita de un personal entrenado y equipamiento de laboratorio adecuado (Cotrina y Fernández, 1991; OIE, 2004a).

V) **Ensayos Inmunoabsorbentes vinculados a Enzimas (ELISA).**

Se han descrito varios tipos de ELISA que se emplean en el diagnóstico de la brucelosis: Los ELISA son inmunoensayos que se caracterizan por su rapidez y facilidad de realización, que presentan una elevada sensibilidad y/o especificidad y son ensayos automatizados que permiten el procesamiento de un gran número de muestras (Samartino, 2004).

a) El ELISA de tipo indirecto (IELISA): que tiene como antígeno el LPS liso de *B. abortus* cepa S1119-3 o S99 y un anticuerpo monoclonal específico para la cadena pesada de la IgG1 bovino marcado con peroxidasa como conjugado (Nielsen y Gall, 1994). El IELISA presenta una elevada sensibilidad, pero no es capaz de diferenciar los anticuerpos resultantes de la vacunación con *B. abortus* cepa 19 de los inducidos por la infección con la cepa de campo (Nielsen *et al.*, 1994). La OIE prescribe su empleo como prueba de pesquiasaje para el comercio internacional (OIE, 2004a). Estos IELISA también se utilizan en la determinación de anticuerpos en leche (Nielsen *et al.*, 1996c; Vanzini *et al.*, 1998; Abalós *et al.*, 2000).

b) En el ELISA competitivo (CELISA) se emplea como antígeno el LPS liso de *B. abortus* cepa S1119-3 y el anticuerpo monoclonal M 84 como conjugado (Nielsen *et al.*, 1995). Este inmunoensayo presenta mayor especificidad que el IELISA y es capaz de eliminar la mayoría de las reacciones debidas a los anticuerpos residuales producidos en respuesta a la vacunación con *B. abortus* cepa 19 (Gall y Nielsen, 1994; Nielsen *et al.*, 1995; OIE, 2004a). El CELISA se emplea como prueba confirmatoria en el diagnóstico de la brucelosis (Uzal *et al.*, 1996; Ábalos *et al.*, 1998; Pérez y Rojas, 1998; Samartino *et al.*, 1998; Uzal *et al.*, 1998; Peraza *et al.*, 1998a y b; Lotterberge *et al.*, 2001).

c) El ELISA DAVIH BRU2: se desarrolló en Laboratorios DAVIH, es un ELISA de tipo indirecto que utiliza como antígeno *B. abortus* cepa 99 obtenido por inactivación, centrifugación y sonicación, y como conjugado una IgG anti Fc bovina marcada con peroxidasa (Argote *et al.*, 1989). En la evaluación de este inmunoensayo en diferentes condiciones epizoóticas se obtuvo un 100 % de Sensibilidad y un 99,6 % de Especificidad. En este sistema se han empleado mezclas de hasta 10 sueros, sin afectar los parámetros de rendimiento del ensayo (Argote y Rodríguez, 1995; Izquierdo *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 2002).

VI) **Ensayo de Polarización Fluorescente (EPF).**

Recientemente, el EPF se ha validado para el diagnóstico de la brucelosis en varias especies (bovina, porcina y caprina) utilizando muestras de suero, sangre y leche. (Nielsen et al., 1996a; McGiven et al., 2003; OIE, 2004a). Este inmunoensayo posibilita efectuar un pesquisaje de los anticuerpos rápido, eficaz y cuantitativo (Samartino, 2004).

La tecnología ABICAP:

A partir de 1998 la firma Biognosis comienza el desarrollo y la producción de una nueva generación de ensayos rápidos para la determinación cuantitativa de parámetros inmunológicos con el uso de la tecnología ABICAP (Biognosis GmbH, 2004). Esta tecnología ha sido utilizada fundamentalmente para el diagnóstico en humano como un método de cuantificación rápida de componentes del complemento, anticuerpos monoclonales y la determinación de anticuerpos a la toxina de la dipteria (Hecke et al. 1997; Pupo, 2001; Bektimirov et al. 1998; Shobukhova et al. 1999).

El ABICAP combina las ventajas de la cromatografía de afinidad y las técnicas de determinación inmunoquímica con el empleo de dos componentes básicos un soporte poroso con una superficie de exposición de 40 cm² y una columna cromatográfica dentro de la cual se dispone el soporte. La reacción antígeno-anticuerpo para el reconocimiento del analito presente en la muestra a investigar, ocurre en el soporte, en el cual la reacción tiene lugar en cuestión de segundos y tanto las muestras como los reactivos fluyen por gravedad a través del mismo sin necesidad de tiempos de incubación, agitación o instrumental (Biognosis Tool, 2004; Biognosis Technology, 2004).

Como sistema de detección emplea el ABICAP-rojo, que consiste en la conjugación de un colorante de color rojo con la estreptavidina mediante el cual se evidencia la reacción en corto tiempo con una señal estable.

El ABICAP tiene como ventajas (Izquierdo et al., 2002; Biognosis, 2003):

- ❖ la cuantificación rápida de los resultados (10 minutos).
- ❖ una automatización sencilla.
- ❖ el equipamiento es simple.
- ❖ permite realizar los ensayos de forma descentralizada.
- ❖ solo requiere precisión en el pipeteo de las muestras.
- ❖ posibilita realizar el diagnóstico junto al animal.

2.7 Determinación de los parámetros de rendimiento de un inmunoensayo.

La normalización de un inmunoensayo es un proceso dinámico, en el que los límites entre este procedimiento y el de validación no están claramente definidos. Una buena normalización permite la obtención de buenos resultados en el proceso de validación y de este último se deriva la necesidad de realizar nuevos ensayos del método (OIE, 2004b).

Los nuevos ensayos deben cumplir con los principios de validación establecidos internacionalmente, que consideran un ensayo validado cuando proporciona resultados coherentes y repetidos que permiten diferenciar entre animales positivos y negativos (determinación de anticuerpos y/o antígenos) o un proceso determinado (induración de la piel en el punto de prueba entre otros) y por inferencia diagnosticar con exactitud la condición de los animales respecto a una infección con un nivel predeterminado de certidumbre estadística (Jacobson, 1998a).

La validación de un ensayo constituye un proceso acumulativo que se divide en dos etapas

fundamentales: (Jacobson, 1998a y b)

I) En la primera se determinan y caracterizan los parámetros de rendimiento del ensayo:

A) Se realiza la normalización del ensayo y se determinan las condiciones de trabajo óptimas de los reactivos químicos y biológicos, la temperatura y el tiempo de incubación en cada etapa, la dilución idónea de las muestras y la preparación de los controles adecuados entre otros aspectos (Nielsen, 1996d).

B) En esta etapa se realizan los estudios de factibilidad para determinar si los reactivos y el protocolo seleccionado identifican los anticuerpos contra el agente infeccioso de interés, con un mínimo de reacciones inespecíficas. Se obtiene una primera estimación de parámetros como:

Sensibilidad analítica: que se conoce como la menor cantidad de anticuerpos (sustancia analizable) detectable en una muestra mediante un ensayo (Wright, 1993).

Especificidad analítica: que se estima mediante un panel de sueros de animales que padecieron procesos infecciosos con los que deben realizarse diagnóstico diferencial con el agente infeccioso que queremos diagnosticar, susceptibles de estimular la producción de anticuerpos con reactividad cruzada (Wright, 1993).

Repetibilidad: es una estimación indicativa de la precisión de un ensayo, donde los resultados se obtienen mediante el mismo método, en unidades idénticas, en el mismo laboratorio, por el mismo analista, usando el mismo equipo y durante cortos intervalos de tiempo. La **repetibilidad intraensayo** se obtiene cuando se procesan varias réplicas (entre 10 y 20) de diferentes muestras de suero (positivo alto, positivo débil y negativo) en un mismo ensayo. Mientras que en la **repetibilidad interensayos** se comparan los resultados obtenidos de 3 a 4 réplicas de las tres muestras en varios ensayos (entre 10 y 20) en un mismo laboratorio. Los valores de las réplicas de las muestras idénticas se analizan para identificar los valores rezagados o atípicos mediante las Dósimas de Grubbs y Cochran (NCE, 2004). Las variaciones en la repetibilidad se estiman a través de estadígrafos como: la X, la DE y el CV (Argote y López, 1995; Jacobson, 1998a y b; Ochoa *et al.* 1999).

C) Determinación de los parámetros de desempeño.

- **Determinación del VC:**

Cuando se procede a la evaluación de un nuevo ensayo con sueros de referencia de animales infectados y no infectados para determinar el VC, se emplean diferentes métodos como son: la distribución de frecuencia de los resultados positivos y negativos, el establecimiento del VC con relación a los resultados de animales no infectados y la determinación del VC intrínseco en ausencia de animales de referencia (Jacobson, 1998 a y b).

Cuando el VC se establece mediante la distribución de frecuencia se pueden emplear tres formas:

a) Una vez que se determina la distribución de frecuencia de los resultados positivos y negativos, en el área en que se superponen ambos resultados, se establece el punto de intersección de ambas distribuciones y el mismo se selecciona

como el VC.

b) EL análisis de las características operantes de un receptor (curva ROC), se basa en la superposición de la curvas de Sd y Ed, y el punto de intercepción se toma como el VC.

c) La selección de un VC que favorezca la Sd o la Ed del nuevo ensayo (Jacobson, 1998 a y b; Jensen, 2000).

- **La Sensibilidad y Especificidad diagnóstica:**

La Sd y Ed se determinan sometiendo a prueba un número de muestras de referencia, tomadas de animales infectados y no infectados, cuya historia y situación sanitaria se conoce con respecto a la enfermedad. El número de muestras de estos animales que son necesarias para la estimación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica, se determina dentro de un intervalo estadísticamente definido (Argote y López, 1995; Jacobson, 1998a).

La Sd se conoce como la proporción de animales infectados que proporcionan un resultado positivo en el ensayo. Los resultados negativos en el ensayo de animales que se conoce que están infectados se denominan falsos negativos. La Ed es la proporción de animales no infectados que resultan negativos en el ensayo. Aquellos animales de referencia no infectados que resultan positivos se consideran falsos positivos (Argote y López, 1995; Jacobson; 1998a).

El VPP se conoce como la probabilidad de identificar los verdaderos positivos en un grupo de animales que resultaron positivos en el ensayo. Por otra parte, el VPN comprende la proporción de verdaderos negativos en el conjunto de negativos (Argote y López, 1995; Jacobson, 1998a).

La E es la capacidad de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y negativos, la cual es óptima en los ensayos en que no se obtengan resultados falsos positivos o negativos (Ochoa *et al.*, 2000).

- **Criterio de comparación para el nuevo ensayo.**

Los resultados del nuevo ensayo se comparan con los obtenidos a través de otro método o una combinación de varios métodos y Jacobson (1998a) describe cuatro criterios de comparación:

a) El criterio de comparación absoluto comprende el aislamiento del agente infeccioso o la determinación de la presencia del mismo por examen histopatológico en el animal, pero en la mayoría de los casos no es posible su aplicación. Además, el empleo de sueros de animales de referencia con este criterio en la evaluación del nuevo ensayo conlleva a que se eleve la sensibilidad diagnóstica.

b) En el criterio relativo se compara el nuevo ensayo con otros ensayos de referencia, en este caso la **sensibilidad y especificidad obtenidas se denominan relativas**. Los ensayos de referencia deben presentar una sensibilidad y especificidad conocidas y cercanas al 100% (Argote y López, 1995; Jacobson, 1998 a y b).

c) En el criterio de comparación accesorio se evalúan las respuestas de anticuerpos de los animales infectados experimentalmente o vacunados, siendo necesaria la extracción secuencial de suero de estos animales. La evaluación de estos sueros muestra la capacidad del nuevo ensayo para detectar la producción temprana de anticuerpos y la dinámica de los anticuerpos elaborados frente al agente infeccioso

(Jacobson, 1998b).

d) En el criterio estándar compuesto se comprueba la ausencia de infección /exposición, pero es difícil considerar un animal como no expuesto a un agente con absoluta certeza, no existe una prueba capaz de descartar de forma concluyente la posibilidad de un resultado falso negativo (Jacobson, 1998b).

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia, se realizan **estudios de concordancia** con la utilización del índice kappa (k) y la prueba de Mac Nemar. El índice k establece una comparación entre los índices de concordancia esperados y los observados (OPS, 1994; Jacobson, 1998a).

II) En una segunda etapa se garantiza la validez continua de los resultados del ensayo y se mejoran los criterios para su validación, para esto se requiere un constante seguimiento de parámetros como la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo, el mantenimiento del rendimiento del ensayo mediante la evaluación sistemática de su Sd y Ed con muestras de referencia de las poblaciones a pesquisar (población local o de un área geográfica diferente) y el perfeccionamiento con el control de la calidad de las muestras y los reactivos que conforman el ensayo (Jacobson, 1998).

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Normalización del inmunoensayo ABICAP-BRU para la detección de anticuerpos contra *Brucella* en suero bovino.

3.1.1 Obtención de componentes.

3.1.1.1 Reactivos suministrados por la firma Biognosis.

a) Columnas cromatográficas (5,5 cm de largo x 6 mm de diámetro) y soportes de poliestireno (5 mm de largo x 4,5 mm de diámetro).

b) Diluyente contiene tampón fosfato, Tween 20, Caseína 5,5 % y Microcid 0,05%. Se empleó como diluyente de los sueros controles, los sueros de referencia y el conjugado.

c) Cromóforo ABICAP-rojo conjugado con estreptavidina.

3.1.1.2 Antígeno:

En la sensibilización de los soportes se empleó el antígeno de *B. abortus* cepa 99 obtenido por inactivación por el método de calor-fenol, centrifugación y sonicación, que se produce en Laboratorios DAVIH⁽¹⁾.

3.1.1.3 Sueros controles

a) Como control positivo se utilizó el suero de un animal procedente de un foco de brucelosis bovina, reactivo a las pruebas de pesquisaje (ELISA y RB) y confirmatoria (RFC) e investigado en el Laboratorio Municipal de Veterinaria de San José de Las Lajas y en Laboratorios DAVIH.

b) El suero positivo débil se preparó a partir del suero control positivo con el suero control negativo en la dilución de 1:128.

c) El suero control negativo se obtuvo de un bovino procedente de un área libre de brucelosis, negativo a *Brucella* comprobado por las pruebas serológicas SAL, RB,

¹69

¹ PNO 03-001: Procedimiento para la obtención del antígeno sonicado (cepa 99) de *Brucella abortus*, Laboratorios DAVIH 2001, 2da edición, p 1-5.

RFC y ELISA DAVIH BRU-2, que se realizaron en el Laboratorio Municipal de Veterinaria de San José de Las Lajas y en Laboratorios DAVIH.

Para la conservación de los sueros se les adicionó como preservativo Bronidox L al 0,05 %, se filtraron por membranas de 0,45 y 0,2 μm , se envasaron en alícuotas de 500 μL en viales plásticos, en condiciones de esterilidad aplicando la Buenas Prácticas de Laboratorio y utilizando gabinete de seguridad biológica clase II, las alícuotas se guardaron a una temperatura de -20°C hasta su utilización. El vial en uso en los ensayos se mantuvo a una temperatura de 2 a 8°C (Wright, 1998).

3.1.1.4 Conjugado.

Para la obtención de la IgG de conejo anti Fc bovino se utilizaron conejos F1 de 2 Kg de peso suministrados por el CENPALAB, que se mantuvieron en jaulas tipo California y con alimentación ad libitum.

Los conejos se inmunizaron con 1 mL del fragmento Fc de la IgG bovino (²) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con Adyuvante Completo de Freund por vía subcutánea. A los 15 días postinoculación se les suministro la misma dosis de la fracción de la IgG con Adyuvante Incompleto de Freund por la misma vía. Quince días después de la segunda inoculación se extrajo una alícuota de sangre para la titulación del antisuero por la técnica de Inmunodifusión Simple (³). Cuando el antisuero alcanzó un título de 1:32 se procedió al sacrificio de los conejos por punción cardíaca.

Se purificó la fracción de IgG de conejo anti Fc bovino ([†]), la cual se conjugó con biotina (Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide ester, Sigma) en una proporción 9 a 1 (anticuerpo/biotina) de acuerdo al procedimiento descrito por Harlow y Lane (1988). El conjugado se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Para determinar la dilución óptima del conjugado se evaluaron las concentraciones 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 9,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 18,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados de cada concentración se compararon por la relación de la media de positivos y negativos (P/N).

3.1.2 Normalización del ABICAP-BRU.

a) Principio del ensayo.

El ABICAP-BRU es un ensayo heterogéneo de tipo indirecto para la detección de anticuerpos contra Brucella en suero bovino.

La aplicación del ensayo comprende las siguientes reacciones:

- Los anticuerpos presentes en la muestra se unen al antígeno fijado en el soporte.

El conjugado es una inmunoglobulina anti Fc de la IgG bovino marcada con biotina, que se une a las IgG anti-brucella retenidas en el soporte.

- El conjugado libre es eliminado con los lavados y la presencia de la enzima inmovilizada se revela por el ABICAP-rojo conjugado con estreptavidina.
- La lectura de la DO se realiza a 505 nm de forma directa en el lector ABICAP, previa calibración con un blanco.

b) Sensibilización de los soportes:

² PNO 02-019: Procedimientos generales para la purificación de IgG. Laboratorios DAVIH 2003, 1ra edición p. 1-4.

70 ³ PNO 02-038: Inmunodifusión simple en agar, Laboratorios DAVIH 2002, 1ra edición p1-3.

Los soportes se colocaron en un tubo de centrífuga de 50 mL con etanol al 50 % y se pusieron a desgasificar por un período de 15 a 20 minutos. Posteriormente se descartó el etanol y se adicionó la solución de sensibilización (tampón bicarbonato-carbonato al 0,05 M, pH 9,6). Se probaron tres concentraciones del antígeno manteniendo los soportes en cada concentración (11 µg/mL, 17 µg/mL y 22 µg/mL) durante 16 a 20 horas en agitación fuerte a temperatura ambiente. Al concluir el paso anterior, se decantó la solución de sensibilización y se agregó la solución de bloqueo (Sacarosa 5%, Seroalbúmina bovina 0,1%, PBS 10X, tiomersal 0,01% y agua destilada) en la cual permanecieron en agitación fuerte por 1 hora a temperatura ambiente los soportes sensibilizados.

Al concluir la etapa de bloqueo, se realizaron 2 lavados con solución tampón Tween 20 y a continuación los soportes se secaron al vacío, en una incubadora a 37 °C de 2 a 3 horas, posteriormente se guardaron a temperatura ambiente en frascos de cristal con bolsas de sílica - gel hasta el momento de su uso.

c) **Los sueros controles** (positivos y negativos) se probaron en el ensayo en las diluciones 1:20, 1:60 y 1:200 para establecer la dilución de trabajo.

d) **El conjugado** anti Fc de la IgG bovino biotinilado se evaluó en las concentraciones 4,7 µg/mL; 9,4 µg/mL y 18,8 µg/mL para determinar la concentración óptima.

e) **El cromóforo** ABICAP-rojo se empleó diluido en Tween 20 en la dilución 1:16.

En el lector ABICAP se realizaron las lecturas a 505 nm en valores de DO previa calibración con un blanco. El blanco contiene todos los componentes menos la muestra y en lugar de esta se añadió PBS 25X.

Como criterio de selección de las diferentes variables (dilución de los sueros, concentración de antígeno y conjugado) se establecieron como parámetros de calidad del sistema que la DO del suero control positivo fuera mayor de 1,00 y la del suero control negativo menor de 0.200, así como, que la relación de las medias de la DO de los controles positivos y negativos (P/N) fuera mayor o igual a 5, en caso de que más de una variable cumpliera con este indicador se seleccionó aquella que mostró mayor valor.

f) **Presentación y preparación de los componentes.**

R1: Columna cromatográfica (5,5 cm de largo x 6 mm de diámetro interno), con soporte de poliestireno (5 mm de largo x 4,5 mm de diámetros), que contiene antígeno de *Brucella abortus* inactivado.

R2: Suero control negativo: Suero bovino negativo a anticuerpos contra *B. abortus*.

R3: Suero control positivo: Suero bovino positivo a anticuerpos contra *B. abortus*.

R4: Solución tampón 25X: Tampón fosfato con Tween 20 concentrado. Se diluye 1:25 con agua destilada, pH entre 7,2 a 7,4. Se emplea para los lavados y es el diluyente del cromóforo.

R5: Diluyente: Contiene tampón fosfato con Tween 20, Caseína 5,5 % y Microcid 0,05%. Esta solución se lleva al 1,1 % de caseína con Tampón fosfato - Tween 20 diluido. Se emplea como diluyente de los controles, muestras y el conjugado.

R6: Conjugado antiFc de la IgG bovino marcada con biotina. Se diluye en R5 de acuerdo a la dilución de trabajo.

R7: Cromóforo: ABICAP-rojo conjugado con estreptavidina. Se diluye 1:16 con R4 en

dilución de trabajo. Añadir 100 µL por cada 1600 mL de R4 diluido.

g) **Realización del ensayo:**

1. Se colocaron todos los reactivos a temperatura ambiente 15 minutos antes de ser utilizados.
2. A cada matriz en su columna se le añadió 1 mL de PBS 1X para facilitar el paso de los reactivos.
3. Las muestras y los controles se diluyeron previamente empleando R5 en dilución de trabajo. Las muestras y los controles se añadieron a razón de 750 µL por cada columna. En cada experimento se colocaron 2 controles positivos, 2 controles negativos y un blanco. Al blanco se le adicionaron todos los reactivos excepto la muestra que se sustituyó por R5.
4. Cada columna se lavó 1 vez con 750 µL de solución R4 diluida y se esperó a que decantara todo el líquido.
5. Se añadieron 750 µL por columna de R6 en la dilución establecida.
6. Se repitió el paso 4.
7. Se añadieron 200 µL de R7 en una dilución de 1:16.
8. Se repitió el paso 4.
9. Se secó la base de la columna y se leyeron las densidades ópticas a 505 nm en el lector ABICAP previa calibración con el blanco.

3.1.3 Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica en el ABICAP se determinó con la preparación de diluciones de base 2 (1:2 hasta 1:256) de un suero positivo en otro negativo, cada una se analizó por duplicado para estimar la dilución del suero a partir de la cual no se detecta la presencia de anticuerpos (Wright *et al.* 1993).

3.1.4 Repetibilidad intra e interensayo.

Repetibilidad intraensayo: Se seleccionaron tres sueros (uno positivo alto, uno positivo débil y uno negativo). Se realizaron 15 réplicas de cada suero en un mismo ensayo.

Repetibilidad interensayo: Se realizaron 4 réplicas de los tres sueros seleccionados en 15 días diferentes (Wright *et al.* 1993; Jacobson, 1998a).

En ambos estudios se calcularon la X, la DE y el CV para cada suero. Los resultados de la repetibilidad se compararon por las Dósimas de Grubbs para estimar la normalidad de los datos y Cochran para determinar la homogeneidad de varianza según la Norma Cubana Experimental (NCE), 2001.

La Dócima de Grubbs: Para su determinación se procedió de la siguiente forma:

1. Se ordenó de forma creciente las medias de las réplicas de las muestras idénticas objeto de análisis.
2. Se calculan los estadígrafos de Grubbs:

$$G_p = (X_{\text{máx}} - X_m) / S$$

$$G_1 = (X_m - X_{\text{mín}}) / S$$

Donde:

G_p = Estadígrafo para la observación mayor.

G_1 = Estadígrafo para la observación menor.

$X_m = 1/n (\sum Xi)$ (la media muestral)

$S = \sqrt{\{[\sum(Xi - X_m)^2] / (n - 1)\}}$ (la desviación típica muestral)

3. Los resultados obtenidos de los estadígrafos se comparan con los valores críticos ($\alpha = 1\%$ y $\alpha = 5\%$) para el tamaño de muestra (n). (Grubbs y Beck; 1972)

La Dócima de Cochran se calculó por el estadígrafo C.

$$C = [(S_{\text{máx}})^2 / \sum(S_i)^2]$$

Donde:

S_i : es el conjunto de desviaciones típicas.

$S_{\text{máx}}$: es la desviación típica de mayor valor dentro del conjunto.

Los resultados obtenidos de los estadígrafos se comparan con los valores críticos para un nivel de confianza de $\alpha = 1\%$ y $\alpha = 5\%$ para el número de réplicas por muestra ($n = 4$) y número de ensayos ($p = 15$).

3.2 Evaluación del ABICAP-BRU en la detección de anticuerpos en suero de animales infectados y no infectados.

a) Muestras empleadas:

En el estudio de los parámetros de desempeño se emplearon 213 sueros de animales infectados (procedentes de un foco de brucelosis del municipio de Consolación del Sur, Pinar del Río, caracterizados por las pruebas SAL, RFC, RB y ELISA DAVIH BRU2) y 357 sueros de animales no infectados (procedentes de un área libre de brucelosis por más de 10 años del municipio de San José de Las Lajas, La Habana, caracterizados por las pruebas RB y ELISA DAVIH BRU2).

b) Ensayos de referencia usados:

A) En la prueba RB el suero a investigar se enfrentó al antígeno de *Brucella abortus* coloreado y a pH ácido. La prueba se desarrolló en placas de aglutinación en las que se depositaron 0,03 mL del suero y el antígeno, ambos se mezclaron con ayuda de un agitador de cristal. La placa se movió suavemente 6 veces en el mismo sentido, se dejó reposar 4 minutos y se realizó la lectura de los resultados, comenzando por los sueros de referencia positivo y negativo como se describe en la Norma Ramal (NRAG, 586).

B) ELISA DAVIH BRU2

Las muestras a investigar y los controles se diluyeron 1:200 en tampón Tween 20 diluido y se colocaron en sus correspondientes pocillos en un volumen de 100 μL . La placa se agitó suavemente, se cubrió con cinta adhesiva y se incubó 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente se lavó la placa 4 veces con 250-300 μL de tampón Tween 20 y se secó invirtiéndola sobre papel de filtro. Se añadió 100 μL por pocillo del conjugado anti-IgG bovino marcado con peroxidasa en su dilución de trabajo, se cubrió la placa con cinta adhesiva y se incubó 45 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Se repitieron los 4 lavados y se añadieron 100 μL del sustrato

cromogénico en cada pocillo, la incubación se realizó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente la reacción se paralizó con 100 µL de ácido sulfúrico 2 molar/L y se realizó la lectura de la densidad óptica a 492 nm como se indica en el manual de instrucción del estuche (⁴).

3.2.1 Determinación de los parámetros de desempeño del inmunoensayo.

3.2.1.1 Estimación del valor de corte.

Los valores de DO obtenidos en el sistema para las muestras de referencia se normalizaron como se describe a continuación:

$$\% \text{ positividad (PP)} = (\text{DO de la muestra} / \text{DO del control positivo}) \times 100.$$

El VC se estimó por la distribución de frecuencia del porcentaje de positividad de las muestras de referencia y el mismo se ajustó mediante el análisis ROC, que incluye la determinación del área bajo la curva con el empleo del programa computarizado Win Episcopo 2.0 (de Blas *et al.*, 1998).

3.2.1.2 Sensibilidad y Especificidad diagnósticas.

Los resultados obtenidos en el ABICAP-BRU se presentaron en una tabla de contingencia de 2 x 2 y se estimó la Sd y la Ed con el empleo de un programa de computación Win Episcopo 2.0, con un límite de confianza del 95 % (Jacobson, 1998 b; de Blas *et al.*, 1998)

Tabla 1. Tabla de contingencia de 2 X 2 para la estimación de la Sd y la Ed asociados con el estado de infección de los animales de referencia

		Animales de referencia		
		infectados	no infectados	total
ABICAP	positivo	a	b	a + b
BRU2	negativo	c	d	c + d
total		a + c	b + d	n

Donde:

- a = número de verdaderos positivos
- b = número de falsos positivos
- c = número de falsos negativos
- d = número de verdaderos negativos
- Sensibilidad (S) = $a / (a + c) \times 100$
- Especificidad (E) = $d / (b + d) \times 100$

3.2.1.3 Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Los VPP y VPN del ABICAP-BRU se calcularon mediante las siguientes formulas: (Jacobson, 1998b; de Blas *et al.*, 1998)

$$\text{VPP} = a / (a + b) \times 100$$

$$\text{VPN} = d / (c + d) \times 100$$

3.2.1.4 Eficacia.

La E del ensayo se determinó por la formula (Argote y López, 1995; Jacobson, 1998b):
 $E = \{(a+d) / (a+b+c+d)\} \times 100.$

3.2.1.5 Sensibilidad y Especificidad relativas. Estimación del índice k.

En la determinación de S_r y E_r se compararon los resultados obtenidos en el ABICAP- BRU con los obtenidos por los ensayos RB y ELISA DAVIH BRU2, como ensayos de referencia.

En la estimación de la concordancia entre el ABICAP- BRU y los ensayos de referencia se empleó el índice k que se calculó de la siguiente manera (OPS; 1994; Ochoa *et al.* 1999):

$$k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

Donde:

$$p_o = \frac{a + d}{n}$$

$$p_e = \frac{(P + N)}{n}$$

$$\text{Concordancia de los positivos (P)} = \left[\left\{ \frac{(a + b)}{n} \right\} \times \left\{ \frac{(a + c)}{n} \right\} \right] \times n$$

$$\text{Concordancia de los negativos (N)} = (c + d) - \{ (a + c) - P \}$$

El índice de concordancia k se clasifica en cinco grupos:

Deficiente < 0,2

Regular 0,21 - 0,4

Moderada 0,41 - 0,6

Buena 0,61 - 0,8

Muy buena 0,81 - 1,0

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Normalización del ensayo ABICAP-BRU para la detección de anticuerpos contra Brucella en suero bovino.

En las primeras fases de la normalización de un inmunoensayo se determinan las condiciones óptimas de trabajo de los reactivos químicos y biológicos, la temperatura y el tiempo de incubación en cada etapa y la dilución idónea de las muestras; así como la preparación de los patrones y controles adecuados entre otros aspectos (Nielsen *et al.* 1996d; Ochoa *et al.* 1999).

En este estudio se determinaron las condiciones de trabajo de los reactivos biológicos (antígeno, sueros controles y conjugado), así como la dilución de trabajo. Los productores de la tecnología ABICAP suministraron los reactivos químicos (diluyente y el cromóforo ABICAP-rojo), por lo que no fue necesaria su normalización ni la de los tiempos y temperaturas de incubación, pues el protocolo de trabajo de este sistema no comprende tiempos de incubación en cada etapa y el procedimiento de ensayo se realiza a temperatura ambiente.

El método denominado "tablero de ajedrez", ampliamente usado por otros investigadores (Argote *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1996d; OIE, 2004a) se utilizó en la normalización del antígeno, sueros controles y el conjugado, cuyos resultados se exponen más adelante. Su empleo resultó de gran utilidad para simplificar la interpretación de los resultados.

4.1.1 Obtención de componentes.

4.1.1.1 Antígeno.

El lipopolisacárido (LPS) en las cepas lisas se considera el antígeno inmunodominante de

Brucella, el mismo es capaz de inducir una fuerte respuesta de anticuerpos medible en los inmunoensayos (Moreno *et al.* 1998). El LPS de *B. abortus* es utilizado con frecuencia como antígeno en las pruebas serológicas por su sensibilidad y fácil preparación. (Nielsen *et al.* 1994).

El antígeno celular *B. abortus* elaborado en nuestro laboratorio a partir de la cepa 99 se obtuvo por inactivación por calor-fenol, centrifugación y sonicación; y hasta el momento se utiliza con buenos resultados, en la sensibilización de las microplacas en el ELISA DAVIH BRU2 para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina (Argote *et al.*, 1989; Argote y Rodríguez, 1995; Ortiz *et al.*, 2002).

En este estudio se realizó la titulación de tres concentraciones del antígeno *B. abortus* cepa 99, para la sensibilización de los soportes ABICAP, como se muestran en la fig. 1. Con la concentración de 22 µg/mL en el ensayo se lograron valores de la DO de los controles positivos mayores de 1,0 y menores de 0,200 en el control negativo que se corresponde con una relación P/N = 5,9, lo que indica que el sistema a esta concentración mostró mayor resolución para diferenciar ambos controles, y por esta razón se seleccionó para el recubrimiento de los soportes. En el ELISA DAVIH BRU 2, este antígeno se utiliza en una concentración menor (11 µg/mL), esta diferencia que se observa en las concentraciones de antígeno utilizada en ambos sistemas, consideramos que está relacionada con la superficie de exposición, que en el caso del soporte ABICAP es de 40 cm², mientras que en el ELISA DAVIH BRU 2 es de solo 9 cm² (Nunc, 1994).

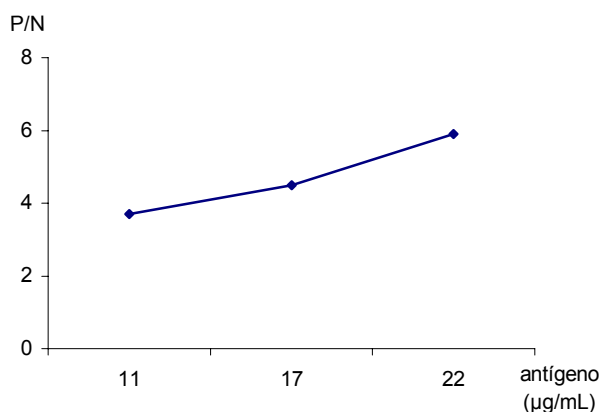


fig.1 Determinación de la concentración óptima del antígeno

4.1.1.2 Sueros controles

La dilución de las muestras de suero es muy importante para la sensibilidad y especificidad del ensayo. Una muestra diluida de forma insuficiente puede originar interacciones inespecíficas, producir resultados falsos positivos y una disminución de la especificidad del ensayo. En caso de que las muestras se preparen muy diluidas pueden ocurrir reacciones falsas negativas y en correspondencia disminuir la sensibilidad del ensayo (Nielsen *et al.* 1996d).

En la mayoría de los inmunoensayos indirectos empleados en el diagnóstico de la brucelosis se utilizan diluciones del suero hasta 1:200, buscando la menor dilución del suero en la cual las interacciones inespecíficas producidas por las proteínas del suero no

interfieran con la interpretación del ensayo (Nielsen *et al.* 1994; Gall *et al.* 1998).

Los resultados obtenidos con las tres diluciones de los sueros controles se muestran en la fig. 2. En las diluciones del suero 1:20 y 1:60 los controles positivos mostraron valores de DO iguales o mayores de 1,0; mientras que los controles negativos presentaron reacciones inespecíficas con valores de DO mayores de 0,400.

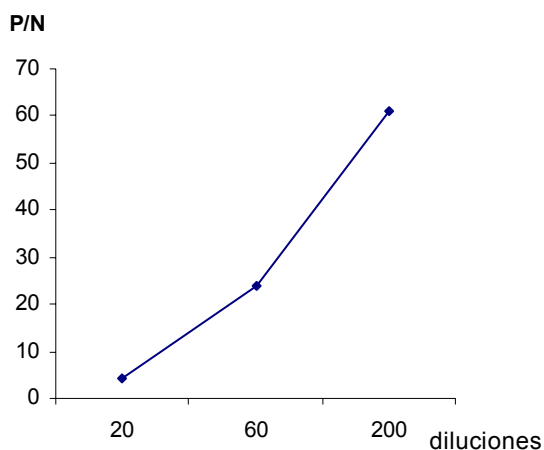


fig. 2 Determinación de la dilución óptima de los sueros controles.

En tanto que en la dilución 1:200, el control positivo alcanzó valores de DO iguales o mayores de 1,3 y en el control negativo menos fondo inespecífico con una DO menor o igual a 0,103. Además en esta dilución se apreció la mayor diferencia $P/N = 66$, por lo que esta dilución se seleccionó como óptima. Con la dilución 1:200 Argote *et al.* (1989) obtuvieron resultados similares en la normalización del ELISA DAVIH BRU2.

4.1.1.3 Conjugado

El conjugado obtenido a partir de IgG de conejo anti Fc bovino biotinilada fue revelado por el ABICAP-rojo conjugado con estreptavidina. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó 4,7 $\mu\text{g/mL}$ de conjugado y con ésta se alcanzó la mayor diferencia en la relación $P/N = 61,6$ (fig. 3). Además se observó una mayor resolución al diferenciar las muestras positivas de las negativas y permitió usar menor cantidad de este reactivo, lo cual disminuye el costo del ensayo.

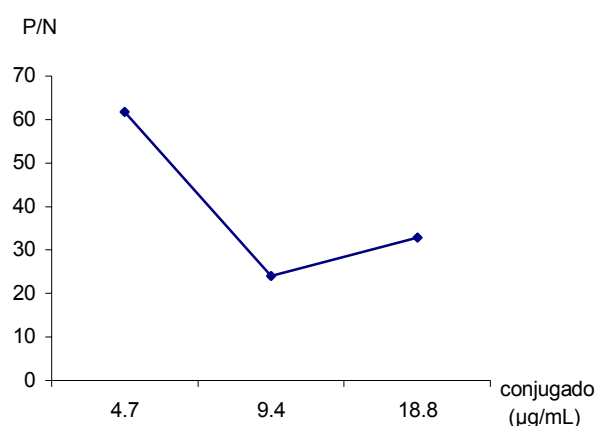


fig. 3 Determinación de la concentración óptima del conjugado.

Los sistemas de amplificación con el marcaje de los anticuerpos con biotina se pueden detectar utilizando como marcador la estreptavidina, que presenta cuatro sitios de unión que incrementan el tamaño del complejo a detectar y amplifican la señal (Harlow y Lane, 1988).

4.1.2 Sensibilidad analítica

Los valores de la DO de las diluciones empleadas para la estimación de la sensibilidad analítica se muestran en la fig. 4, se estableció 1:128 como la sensibilidad analítica del sistema, por ser la última dilución en la que se detectó la presencia de anticuerpos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ortiz *et al.* (2004) que determinaron una sensibilidad analítica igual o mayor a 1:128 para el ELISA DAVIH BRU2.

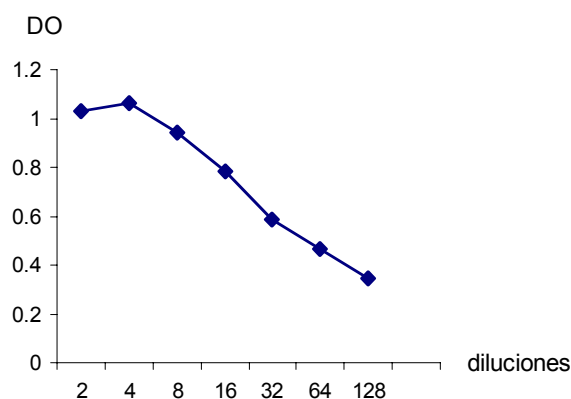


fig 4. Sensibilidad analítica del ABICAP- BRU

4.1.3 Repetibilidad intra e interensayo

La repetibilidad es un indicador de la precisión de un ensayo y siempre que obtengamos una menor dispersión de los resultados de las réplicas podemos considerarlo como índice de una buena precisión (OIE, 2004b).

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la repetibilidad intraensayos del ABICAP-BRU,
78

en todas las réplicas del suero positivo alto se obtuvieron valores de la media de la absorbancia superiores a los 30 PP establecidos como VC, mientras que la media del suero negativo presentó valores inferiores a los del VC. De acuerdo con los parámetros de calidad establecidos para el sistema, se corresponde con el comportamiento esperado según Wrigt *et al.* (1993).

Por otra parte, el CV de los tres sueros mostró una variación entre un 7,5 % y un 10,8 %, considerado como óptimos (Argote *et al.*, 1995; Jacobson, 1998b). Los estadígrafos G_1 y G_p , de la Dócima de Grubbs, presentaron valores menores que los establecidos como críticos para los niveles de confianza del 1 % y el 5 %, lo cual evidencia que existe homogeneidad entre las réplicas (NCE, 2001).

Tabla 2. Repetibilidad intraensayos del ABICAP-BRU

Sueros	n	X	DE	CV (%)	Dócima de Grubbs*
Positivo alto	15	1,579	0,04	10,1	$G_1 = 1,35$ $G_p = 1,58$
Positivo débil	15	0,320	0,006	7,5	$G_1 = 1,67$ $G_p = 2,33$
Negativo	15	0,120	0,003	10,8	$G_1 = 1,46$ $G_p = 2,38$

Dócima de Grubbs*: G_1 y $G_p \leq$ valor crítico
valor crítico con un α al 1%: 2,549 y α al 5 %: 2,806, para $n = 15$ (ISO 5725-2, 1994, epígrafe 8.1)

En los interensayos del ABICAP-BRU (Tabla 3), la media de los tres sueros presentó un comportamiento similar al observado en los intraensayos. El CV de los sueros positivo alto y negativo fue óptimo con valores inferiores al 10 %, los resultados del suero positivo débil a pesar de ser más elevados (14,1 %), se pueden considerar aceptables de acuerdo con lo planteado por Nielsen *et al.*, (1996d) y la OIE (2004a), quienes afirman que el CV puede ser menor de un 20 % cuando en la estimación de este estadígrafo se emplean valores de absorbancia no normalizados. En los interensayos no se encontraron diferencias significativas según las G_1 y G_p obtenidas respecto a los valores críticos para el 1 % y el 5 %. (NCE, 2001)

Tabla 3. Repetibilidad interensayos del ABICAP-BRU

Sueros	n	X	DE	CV (%)	Dócima de Cochran**	Dócima de Grubbs*
Positivo alto	15	1,341	0,03	7,9	$C = 0,082$	$G_1 = 1,279$ $G_p = 1,923$
Positivo débil	15	0,393	0,013	14,1	$C = 0,263$	$G_1 = 1,314$ $G_p = 1,490$
Negativo	15	0,139	0,002	5,8	$C = 0,308$	$G_1 = 1,375$ $G_p = 2,0$

Dócima de Cochran**: $C \leq$ valor crítico

Valor crítico para α al 1%: 0,332 y α al 5 %: 0,276 para $n = 4$ y $p = 15$

Dócima de Grubbs*: G_1 y $G_p \leq$ valor crítico para un α al 1%: 2,549 y α al 5 %: 2,806 para $n=15$ (ISO 5725-2, 1994, epígrafe 8.1)

Para los sueros positivo alto y positivo débil se obtuvieron valores del estadígrafo C inferiores al valor crítico al 1 % y el 5 %, por lo que se logró homogeneidad de varianza en los resultados de los 15 ensayos (NCE, 2001). Sin embargo, para el suero negativo el valor de C fue mayor que el valor crítico para el 5 %. Jacobson (1998 b) señala que cuando los valores de absorbancia del suero negativo se encuentran cercanos a cero se

puede esperar una mayor variación interensayos.

Los resultados satisfactorios en la normalización de los componentes biológicos (el antígeno, los sueros controles y el conjugado), la sensibilidad analítica y la repetibilidad del ABICAP-BRU, posibilitan comenzar con la evaluación del sistema.

4.2 Evaluación del ABICAP-BRU en la detección de anticuerpos en suero de animales infectados y no infectados.

4.2.1 Determinación de los parámetros de desempeño

4.2.1.1 Estimación del valor de corte.

El ABICAP-BRU se diseñó como ensayo de pesquiasaje de anticuerpos contra *Brucella*, por este motivo se le confirió especial importancia a la sensibilidad por su efecto en el cálculo del valor predictivo de negatividad así como en la eficacia de la prueba para impedir que permanezcan animales infectados en la masa a estudiar (Jacobson; 1998b).

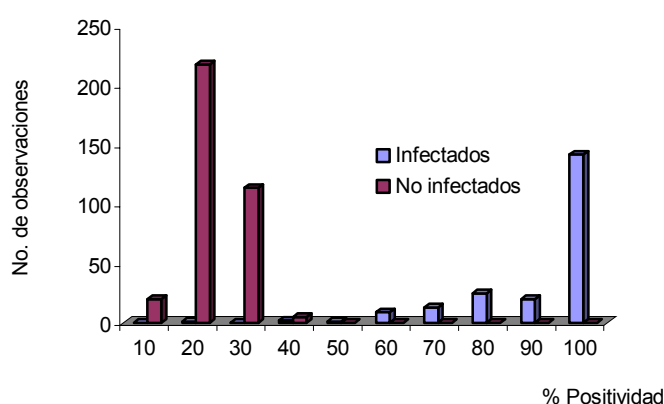


fig. 5 Distribución de frecuencia según el porcentaje de positividad obtenido con el ABICAP-BRU en la evaluación de las muestras de suero de los animales infectados y no infectados.

En la fig. 5 se aprecia la distribución de frecuencias según el porcentaje de positividad de las muestras de animales infectados y no infectados estudiados para el cálculo del VC del sistema y en la fig. 6 el análisis ROC desarrollado con el mismo propósito, por ambos métodos se asumió 30 PP como el VC más indicado por presentar los mejores valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica, así como la mayor área bajo la curva ROC. Jacobson, (1998 a y b), señala que el sistema más exacto es aquel cuya curva ROC cubra la mayor superficie. Greiner *et al.* (2000) considera el valor 0,99 para el área bajo la curva, como altamente satisfactorio para discriminar los resultados positivos y negativos.

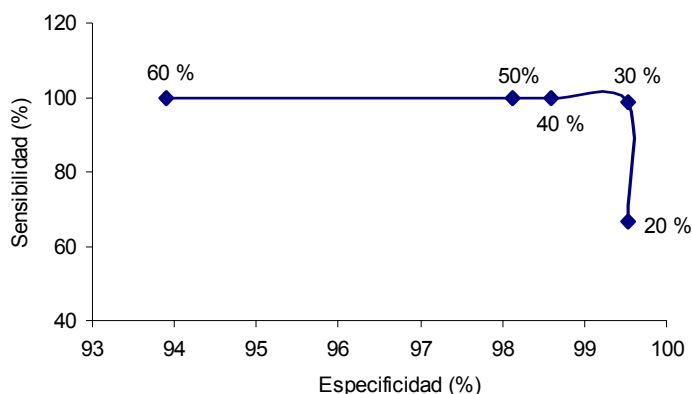


fig. 6 Determinación del valor de corte del ABICAP-BRU para diferentes porcentajes de positividad mediante el análisis ROC.

4.2.1.2 Sensibilidad y Especificidad diagnósticas

La aplicación de un VC de 30 PP a los resultados obtenidos con el ABICAP-BRU en la evaluación de los sueros de referencia (Tabla 4), permitió clasificar 212 muestras de suero positivas de referencia como verdaderos positivos y una como falso negativo que representa una Sd del 99,5 % (Tabla 5), esto indica que el sistema solo identificó un 0,5 % de los bovinos como no infectados.

Tabla 4. Resultados de la evaluación del ABICAP-BRU.

		Infectados	No infectados	Total
ABICAP	positivos	212	5	217
BRU	negativos	1	352	353
	total	213	357	570

Nivel de confianza 95 %

Por otra parte, con relación a las muestras de los animales no infectados procedentes de un área libre, el ensayo identificó 352 muestras negativas de referencia como verdaderos negativos y 5 muestras como falsas positivas para una Ed del 98,6 % (Tabla 5); por lo tanto el 1,4 % de estos animales fue clasificado como infectados. En este estudio con el VC seleccionado buscamos que los valores de Sd y Ed fueran elevados para que el sistema pueda ser empleado como prueba de pesquisaje en el programa de vigilancia nacional.

Los valores de Sd y Ed obtenidos son comparables a los encontrados por Peraza *et al.* (1998) en el IELISA (98,8 % - 94,0 %); Samartino (2004) en el CELISA (99,3 % - 99,6 %) y en el EPF (99,7 % - 99,6 %); y Argote *et al.* (1995) en el ELISA DAVIH BRU2 (100 % - 99,6 %). La Sd obtenida fue superior a la correspondiente a la SAL (70,4 %) y la RFC (85,2 % - 97,5 %) según Argote *et al.* (1995), Nielsen (2002) y Samartino (2004).

Tabla 5. Estimación de los parámetros de desempeño Sd, Ed, VPP y VPN para el ABICAP-BRU

Parámetros	%	IC*
Sensibilidad	99,5	98,6 -100,0

Especificidad	98,6	97,4 - 99,8
VPP	97,7	95,7 - 99,6
VPN	99,7	99,1 - 100,0

* IC (intervalo de confianza)

4.2.1.3 Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

La sensibilidad y la especificidad no son los únicos parámetros indicadores de la calidad de un ensayo debido a que ambos pueden variar según la situación epidemiológica y de acuerdo con esto Argote y López (1995) señalan la importancia del empleo de los valores predictivos en la evaluación de un inmunoensayo.

En la Tabla 5 se observan los resultados del cálculo de los valores predictivos estimados para el sistema ABICAP-BRU. Como se puede apreciar, ambos valores predictivos son elevados en correspondencia con la Sd, la Ed y la prevalencia de la enfermedad (37,4 %) estimada con el programa WinEpiscope 2.0 para el sistema. Los valores predictivos se modifican drásticamente de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad, usualmente cuando la prevalencia de la enfermedad es baja se produce un descenso del VPP y un incremento del VPN, de acuerdo con Jacobson (1998) con la Sd y Ed estimadas en este estudio para una prevalencia del 1 % a nuestro ensayo le correspondería un VPP del 49,7 % y un VPN del 100 %. Sin embargo, en nuestro país existe una baja prevalencia de esta enfermedad por lo que nuestro objetivo es que el ABICAP-BRU mantenga un elevado VPN y de esta manera minimizar la probabilidad de que permanezcan animales falsos negativos en el rebaño.

4.2.1.4 Eficacia.

El ABICAP-BRU presentó una E del 98,9 %, debido a que se detectaron un suero falso positivo y cinco sueros falsos negativos, consideramos que este valor de la E es elevado, por estar cercano al 100 % que Ochoa (2000) señala como de una eficacia óptima y que solo se logra cuando en el ensayo no se detecta ningún suero falso positivo o falso negativo.

4.2.1.5 Sensibilidad y Especificidad relativas. Estimación del índice kappa.

En las Tablas 6 y 7 se muestran los resultados de la comparación entre ABICAP-BRU/RB y el ABICAP-BRU/DAVIH BRU2, en ambos casos se observaron valores elevados de k, los cuales son admitidos como de muy buena correlación entre los ensayos. (OPS, 1994; Nielsen *et al.* 1996 b; Ochoa, 2000).

Tabla 6. Resultados de la Sensibilidad y la Especificidad relativas y el índice k establecidos en la comparación entre las pruebas ABICAP-BRU y RB.

		RB		
		positivo	negativo	total
ABICAP BRU	positivo	212	5	217
	negativo	1	352	353
total		213	357	570

Nivel de confianza 95 % Sr: 99,5 % Er: 98,6 % k = 0,98

Cuando por estudios microbiológicos o histopatológicos no es posible determinar la presencia o ausencia del agente etiológico de la enfermedad se utilizan uno o varios ensayos de referencia que cuenten con parámetros de rendimiento aceptables y bien establecidos (Argote y López; 1995; Jacobson, 1998a). Al igual que la concordancia, los valores de Sr y Er del estudio fueron elevados, esto reafirma los resultados anteriores.

Tabla 7. Resultados de la Sensibilidad y la Especificidad relativas y el índice k establecidos en la comparación entre las pruebas ABICAP-BRU y el ELISA DAVIH BRU2

		DAVIH positivo	BRU2 negativo	total
ABICAP BRU	positivo	212	5	217
	negativo	5	348	353
	total	217	353	570

Nivel de confianza 95 % Sr - 97,7 % Er - 98,6 % k = 0,96

5. DISCUSIÓN GENERAL.

El diagnóstico de la brucelosis se realiza por métodos bacteriológicos y serológicos, sin embargo, en la práctica la serología constituye la herramienta más importante en el diagnóstico de la enfermedad. El diagnóstico serológico comenzó hace más de 100 años y desde entonces se han desarrollado diversas técnicas con el objetivo de lograr métodos

precisos, con gran sensibilidad y especificidad. No obstante, ningún ensayo detecta el 100 % de los animales infectados y por este motivo la mayoría de los países utilizan dos o más pruebas de acuerdo a sus necesidades, niveles de prevalencia y capacidad de los laboratorios. Generalmente el diagnóstico se inicia con un ensayo de pesquisaje (rápido, de fácil interpretación y sensible); con los cuales son examinados todos los animales, aquellos con resultados reactivos en el pesquisaje se confirman con otro método más específico (Samartino, 2004) .

En la actualidad en el algoritmo diagnóstico de nuestro país se emplean como ensayos de pesquisaje la SAL, la RB, la prueba del anillo, el 2ME y el ELISA; y como confirmatoria la RFC, estos se utilizan de forma combinada en la evaluación de la dinámica de anticuerpos para detectar reacciones falsas positivas, en animales reactivos procedentes de áreas libres de la enfermedad. (Vera *et al.*, 1999; Martín y Peñate, 2004)

En los últimos años se ha promovido el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido no instrumental que permitan la realización del diagnóstico junto al animal sin emplear el equipamiento de laboratorio. Como ejemplos de este tipo de inmunoensayos se encuentran los inmunocromatográficos y dentro de estos la tecnología ABICAP (Barrera, 2002).

El ABICAP se ha utilizado principalmente para la determinación de la concentración de los componentes del complemento (C3a y C5a) en plasma (Hartman *et al.* 1993; Stove *et al.* 1996; Hecke *et al.* 1997), para la detección de anticuerpos en la toxina de la difteria (Bektimirov *et al.* 1998; Shobukhova *et al.* 1999) y para la caracterización de anticuerpos monoclonales contra el virus Dengue (Pupo, 2001).

La adecuada normalización de un ensayo y su posterior validación requieren como elementos imprescindibles para alcanzar resultados confiables, la homogeneidad de los reactivos biológicos y químicos a lo largo de las diferentes etapas de estudio. El objetivo fundamental del proceso de validación es conseguir que un resultado positivo o negativo permita deducir con exactitud la condición de un animal respecto a la infección en estudio (Ochoa, 2000; OIE, 2004).

El sistema ABICAP-BRU es el primer inmunoensayo rápido normalizado en nuestro país con la tecnología ABICAP para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. En su normalización se emplearon dos componentes muy importantes ya utilizados en el sistema DAVIH BRU 2 (antígeno y conjugado). El comportamiento de estos fue el esperado y de esta forma se ratificó lo descrito en la literatura respecto a la importancia de emplear antígenos que contengan lipopolisacárido O, debido a su valor antigénico en las pruebas

serológicas, lo cual confiere una alta sensibilidad a los sistemas que lo emplean. Por otra parte, el empleo de un conjugado dirigido hacia las IgG, no solo garantiza la detección de la inmunoglobulina más importante en el diagnóstico de la brucelosis sino que también evita en gran medida la aparición de reacciones falsas positivas relacionadas con las IgM (Nielsen, 2002).

En el estudio de los parámetros de desempeño se obtuvieron resultados convincentes respecto al funcionamiento del sistema, que nos permiten asegurar que existe una alta probabilidad de que los resultados del ensayo se correspondan con el estado del animal respecto a la enfermedad, de esta manera el veterinario no solo podrá contar con un sistema rápido y de fácil ejecución sino también podrá confiar en los resultados del ensayo.

Es importante destacar que el elevado valor predictivo que se observó en el estudio, incluso investigando una muestra donde prácticamente el 50 % correspondían a animales infectados, nos permite asegurar que las probabilidades de que existan reacciones falsas negativas durante el pesquiasaje serológico con ABICA – BRU son mínimas, esto es de gran importancia pues asegura el éxito de esta actividad, al limitar las probabilidades de que queden en el rebaño investigado animales infectados no diagnosticados por el sistema, que mas tarde pudieran diseminar la infección entre los animales sanos.

6. CONCLUSIONES

1. Se logró la normalización del primer inmunoensayo rápido con la tecnología ABICAP para el diagnóstico junto al animal de la brucelosis bovina en nuestro país.
2. La evaluación de los parámetros de desempeño del sistema nos permiten considerar que el mismo puede ser empleado en el pesquiasaje serológico de esta enfermedad.

7. RECOMENDACIONES

1. Ampliar la evaluación de los parámetros de desempeño, principalmente con el estudio de un mayor número de muestras de diferentes categorías epidemiológicas.
2. Determinar la especificidad analítica del sistema.
3. Crear condiciones para su escalado productivo y posible introducción en nuestro programa de vigilancia de la brucelosis bovina.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Abálos, P., Daffner, L., Pinochet, L. Evaluation of three *Brucella* soluble antigens used in an indirect ELISA to discriminate S19 vaccinated from naturally infected cattle. *Veterinary Microbiology*, Junio 2000, vol. 71, n° 1-2, p. 161-167.
2. Abálos, P., Pinochet, L., Ibarra, L. et al. Use of an indirect enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis and epidemiological studies of *Brucella abortus* in Chile. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Austria, November 1998. pp: 49-54. IAEA-TECDOC-1055.
3. Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. *Celular and Molecular Immunology*. Editado por Wonsiewics, J.M. 1ª ed. Philadelphia (USA): W.B. Saunders Company, 1991. pp. 124-234. ISBN 0-7216-3032-4.
4. Acha, P.N., Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Volumen I. Bacteriosis y micosis. Capitulo Brucelosis. Editado por Organización Panamericana de la Salud, 3ª ed. Washington D.C. (USA): Publicación Científica y Técnica No. 580, 2003, pp. 28-55. ISBN 92 75 31580 9 (volumen I).
5. Al-Khalaf, S., El-Khalad, A. Brucellosis of camels in Kuwait. *Comparative*

- Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 1989, vol. 12, n° 1-2, p. 1-4.
6. Aréstegui, B.M., Gualtieri, S.C., Domínguez, J. *et al.* El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Veterinaria México*, Abril 2001, vol. 32, n° 2, p. 131-139.
 7. Argote, E., Rodríguez, O., Sánchez, I. *et al.* Aplicación de la técnica ELISA en el diagnóstico de la brucelosis bovina en Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, Junio 1989, vol. 20, n° 2, p. 181-188.
 8. Argote, E., López, G. Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnósticos basados en la técnica ELISA. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, Agosto 1995, vol. 24, n° 2, p. 16-19.
 9. Argote, E., Rodríguez, O. Diagnóstico de brucelosis bovina empleando el sistema microELISA DAVIH BRU2. *Revista de Salud Animal*, Abril 1995, vol. 17, n° 1, p. 39-44.
 10. Barrera, M. Disponibilidad de técnicas de inmuno-diagnóstico en el diagnóstico veterinario. En actas del XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Palacio de Convenciones de La Habana, 18-22 de Noviembre 2002. pp: 12-16.
 11. Bektimirov, T.A., Petrov, V.F., Miete, P. *et al.* Certification of a kit for immunologic test. *Zhurnal. Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*, Marzo-Abril 1998, vol. 2 (suplemento), p. 39-43.
 12. Betsy J. B., Ewalt, D.R., Macmillan, A. P. *et al.* Molecular Characterization of *Brucella* Strains Isolated from Marine Mammals. *Journal of Clinical Microbiology*, Marzo 2000, vol. 38, n° 3, p. 1258-1262.
 13. Biancifiore, F. Use of non-conventional tests for the diagnosis of brucellosis. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Vienna, Austria, November 1998. pp: 95-103. IAEA-TECDOC-1055.
 14. Biognosis GmH Tool [web en lineal. http://www.biognosis.info/ABICAP_Tool_16.1.html] >[Consulta: 23 de noviembre de 2004].
 15. Biognosis GmH: Biognosis [web en lineal. <http://www.biognosis.info/Biognosis.1.1.htm1>] >[consultada: 5 de octubre de 2004].
 16. Biognosis GmH: Technology [web en lineal. http://www.biognosis.info/ABICAP-Technology_5.1.html] >[Consulta: 23 de noviembre de 2004].
 17. Biognosis. High Speed Quantitative Diagnostics. [web en lineal. <http://www.biognosis.info/Biognosis.1.1.htm1>] >[consulta: 5 de octubre de 2003]
 18. Blank, O., Retamol, P., Abálos, P. *et al.* Detección de anticuerpos anti-brucella en focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) de Cabo, Shínef, Antártica. *Archivos de Medicina Veterinaria*, Junio 2002, vol. 34, n° 1, p 117-122.
 19. Brooks, F.G., Butel, S.J., Morse, A.S. *Jawetz, Melnick & Adalberg's Medical Microbiology*. Capítulo 19. *Haemophilus, Bordetella & Brucella*. Editado por Butler, P.J. 1ª ed. Stanford, Connecticut: Appleton & Lange, 1998, pp. 245-249. ISBN 0-8385-6316.
 20. Carter, R.G., Chengappa, M.M. *Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos esenciales*. Capítulo 24. *Brucella*. Editado por Carter, R.G., Chengappa, M.M. 2ª ed. C. V., México: Editorial El Manual Moderno, S. A., 1994, pp. 351-360. ISBN 968-426-679-0.
 21. Chin, J. *El control de las enfermedades transmisibles*. Editado por Chin, J. 17ª ed. Informe Oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública. Washintong, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001, Publicación Científica y Técnica No. 581, pp.34-38. ISBN 92 75 31581 7.
 22. Corbel, M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactions. *Veterinary Bulletin*, Diciembre 1985, vol. 55, n° 12, p. 927-942.
 23. Corbel, M.J. (1997): Brucellosis: An overview. *Emerging Infectious Diseases*, Abril-Junio 1997, vol. 3, n° 2, p. 213-221.
 24. Cotrina, N., Fernández, A. *Brucelosis problema sanitario y económico*. Editado por Calvo, C., Barnet, R. 1ª ed. Ciudad de La Habana (Cuba): Editorial Científico-Técnica, 1991, pp. 18-21, 44, 57-58, 67-68, 70-88.

25. De Blas, N., Ortega, C., Fankena, K., *et al.*, WIN EPISCOPE 2,0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, Mayo 1998, vol. 148, nº 18, p. 567-572.
26. FAO (Pub la Dirección de Producción y Sanidad AniFAO) Fundación para la lucha contra la Fiebre Aftosa de Entre Ríos. Paraná, © 2003 FU.CO.F.A. [consulta: 24 de Mayo de 2004]. <<http://www.fucofa.comm/prensa/articulo.asp?this.article.id=2454692.56>>.
27. Gall, D., Nielsen, K. Improvements to the competitive ELISA for the detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle sera. *Journal of Immunoassay*, Junio 1994, vol. 15, nº 3, p. 277-291.
28. Gall, D., Colling, A., Merino, O., *et al.* Enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Vienna, Austria, November 1998. pp: 113-129. IAEA-TECDOC-1055.
29. Gerbier, G., Garin-Bastuji, B., Pouillot, R., *et al.* False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9 in a field trial. *Veterinary Research*, Julio-Agosto 1997, vol. 28, nº 4, p. 375-383.
30. Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., *et al.* How to substantiate eradication of bovine brucellosis when inespecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*, Diciembre 2002, vol. 90, nº 1-4, p. 461-477.
31. Golding, B., Scott, E., Scharf, O., *et al.* Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection*, Enero 2001, vol. 3, nº 1-4, p. 43-48.
32. González, T., Villa, J., del Palacio, E., *et al.* El test de Angus y Bacton (BPA) como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina, *Revista de Medicina Veterinaria*, Enero 1989, vol. 70, nº 1, p. 34-36.
33. Greiner, M., Pfeiffer, D., Smith, D.R. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis of diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, Mayo 2000, vol. 45, nº 1-2, p. 23-41.
34. Grubbs, F., Beck, G. Extensión de tamaños de muestra y puntos de porcentaje para ensayos de significación de observaciones erráticas o atípicas. *Technometrics*, 1972, vol. 14, p. 849-854.
35. Harlow, E., Lane, D. *A Laboratory Manual Antibodies*. Editado por Harlow, E., Lane, D. 1ª ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, pp. 340-341. ISBN 0-87969-314-2.
36. Hartmann, H., Lübbers, B., Casaretto, M., *et al.* Rapid quantification of C3a and C5a using a combination of chromatographic and immunoassay procedures. *Journal Immunological Methods*. Noviembre 1993, vol. 166, nº 1, p. 35-44.
37. Hecke, F., Schmidt, U., Kola, A., *et al.* Circulating complement proteins in multiple trauma patients-correlation with injury severity, development of sepsis and outcome. *Critical Care Medicine*, Diciembre 1997, vol. 25, nº 12, p. 2015-2024.
38. Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Editado por Hensyl, R.W. 9ª Maryland (USA): Williams & Wilkins, 1994, pp. 79, 137-138. ISBN 0-683-00603-7.
39. Izquierdo, M., Silva, E., Martín, R. Z. Empleo del sistema ELISA DAVIH BRU2 para detectar anticuerpos frente a *Brucella* en mezclas de sueros. *Revista de Salud Animal*, Enero 1998, vol. 20, nº 1, p. 1-3.
40. Izquierdo, M., Silva, E., Ortiz, E. *et al.* Nueva Tecnología para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. En actas del XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Palacio de Convenciones de La Habana, 18-22 de Noviembre 2002. pp: 32-36.
41. Jacobson, R.H. (a) Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Revue scientifique et technique Office international des Epizooties*. Agosto 1998, vol. 17, nº 2, p. 507-526.
42. Jacobson, R.H. (b) Principles of validation of diagnostic assay for infectious diseases. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA

- in Vienna, Austria, November 1998. pp: 15-23. IAEA-TECDOC-1055.
43. Jensen, A.L. Alternative ways of evaluating test results. *Revue Médecine Vétérinaire*, Julio 2000, vol. 151, n° 7, p. 593-599.
 44. Leal, D., Barbosa, A., Flores, M., et al. Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de México. *Bioteología Aplicada*, Julio-Septiembre 1999, vol. 16, n° 3, p. 149-153.
 45. López, A. Brucelosis nuevos retos en el control. Brucelosis, un problema de salud pública aun sin resolver. En actas del XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Palacio de Convenciones de La Habana, 18-22 de Noviembre 2002. pp: 18-23.
 46. Lotterberger, J., Pauli, R., Vanasco, N.B. Desarrollo y evaluación del ELISA IgG para diagnóstico de brucelosis bovina. III Congreso Argentino y II Congreso Latinoamericano de Zoonosis, Buenos Aires, 6-10 de Agosto del 2001.
 47. Martín, Y. Identificación de cepas cubanas de *Brucella* mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y métodos microbiológicos. Tesis para optar por el Título de Master, inédita, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Ciudad de La Habana, 1997, pp. 5-10, 34-37.
 48. Martín, Y., Peñate, O. Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis. Seminario-Taller Zoonosis bacterianas de impacto para los países de América Latina. Sociedad Cubana de Microbiología Veterinaria, 19-21 de mayo 2004. pp: 20-21.
 49. McGiven, J.A., Tucker, J.D., Prrett, J.A., et al. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and iELISA. *Journal Immunological Methods*, Julio 2003, vol. 278, n° , p. 171-8.
 50. Montes, I. Diagnóstico de la brucelosis. Control Calidad SEIMC, 2004, [consulta: 27 de Mayo de 2004] <http://www.seime.org/control/revi_serodiagbruce.htm>.
 51. Moreno, E., Rojas, N., Nielsen, K., et al. Comparison of different serological assays for the differential diagnosis of brucellosis. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Austria, November 1998. pp: 153-162. IAEA-TECDOC-1055, ISSN 1011-4289.
 52. Moriyón, I., López-Goni, I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internal Microbiology*, Marzo 1998, vol. 1, n° 1, p. 19-26.
 53. NCE (Norma Cubana Experimental) *Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos*, 1ª Edición, 7ª Revisión, Junio. ICS: proyecto 2001.
 54. Nielsen, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Archivos de Medicina Veterinaria*, Junio 1995, vol. 27, n° 1, p. 9-17.
 55. Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, Diciembre 2002, vol. 90, n° 1-2, p. 447-459.
 56. Nielsen, K., Gall, D., Kelly, W., et al. (d): *Immunoassay Development. Application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis*. Edited by Agriculture and Agri-Food, Canada, 1996, p 18.9. ISBN 0-662-24163-0.
 57. Nielsen, K., Gall, D., Tolley, M., et al. (a). A homogeneous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal Immunological Methods*. Septiembre 1996, vol. 195, n° 1-2, p. 161-168.
 58. Nielsen, K., Gall, D. Advances in the diagnostic of bovine brucellosis: use of enzyme immunoassay. *Genetic Engineering Biotechnology*. 1994, vol. 14, n° 1, p. 25 -39.
 59. Nielsen, K., Kelly, L., Gall, D., et al. (b). Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, Febrero 1996, vol. 26, n° 1, p. 17-32.
 60. Nielsen, K., Kelly, L., Gall, D., et al. The use of divalent cation chelating agents (EDTA/EGTA) to reduce non-specific serum protein interaction in enzyme immunoassay. *Veterinary Research Communications*, Junio 1994, vol. 18, n° 6, p. 433-437.
 61. Nielsen, K., Smith, P., Gall, D., et al. (c) Development and validation of an indirect

- enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Veterinary Microbiology*, Septiembre 1996, vol. 52, nº 1-2, p. 165-173.
62. NRAG 586:1982. *Diagnóstico Veterinario. Brucelosis. Métodos de ensayo*. Ministerio de la Agricultura, Norma Ramal, Cuba.
63. Nunc. Adsorption geometry in Nunc-Immuno products. *Nunc Bulletin*, Editorial Edge Effectin MicroWellELISA, Octubre 1994 No. 1, p 3 - 4.
64. Ochoa, R., Martínez, J., Estrada, E., et al. Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*, Enero-Marzo 2000, Año 9, No 1 p. 17-20.
65. Ochoa, R., Martínez, J., Ferriol, X., et al. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*, Octubre 1999, Año 8, No 10 p. 9-13.
66. OIE (a) Bovine Brucellosis. En *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, 5ta Edition, OIE, París, 2004, pp. 1-23.
67. OIE (b) Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infections Diseases. En *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines*, 5ta Edition, OIE, París, 2004, pp. 1-10.
68. OPS *Manual de Procedimientos de Control de la Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre*. Evaluación de los métodos serológicos. Washington, DC. Febrero, 1994, p. 13-20. En español, PAHO/HPC/HCT/94.21.
69. Ortiz, E., Izquierdo, M., Pérez, MT., et al. Estabilidad en estante del diagnosticador DAVIH BRU 2. *Revista de Salud Animal*, Diciembre 2005, vol. 27, nº 3, p. 159-165.
70. Ortiz, E., Silva, E., Izquierdo, M., et al. Estudio serológico de la brucelosis bovina empleando el sistema DAVIH BRU2. *Revista de Salud Animal*, Diciembre 2002, vol. 24, nº 3, p. 161-165.
71. Paweska, J.T., Potts, A.D., Harris, H.J., et al. Validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Brucella abortus* in cattle sera using an automated ELISA workstation. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, Marzo 2002, vol. 69, nº 1, p. 61-77.
72. Peraza, C., Valdés, O., Fonseca, N., et al. (a). Use of an indirect ELISA for *Brucella abortus* diagnosis in Cuba. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Vienna, Austria, November 1998. pp: 89-94. IAEA-TECDOC-1055.
73. Peraza, C., Valdés, O., Fonseca, N., (b). Evaluation of four immunoassays for diagnosis of brucellosis in Cuba. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Vienna, Austria, November 1998. pp: 141-152. IAEA-TECDOC-1055.
74. Pérez, B. y Rojas, M. Field trial of brucellosis competitive ELISA. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Vienna, Austria, November 1998. pp: 169-180. IAEA-TECDOC-1055.
75. Pupo, M. *Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra el virus Dengue y su aplicación al conocimiento de algunas propiedades virales y al diagnóstico de la infección en humanos*. Tesis doctoral inédita, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Ciudad de La Habana, 2001, pp. 10-22.
76. Samartino, E.L., Gregoret, J.R., Siegel, G. (1998). Field trial of a brucellosis competitive enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA). En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Vienna, Austria, November 1998. pp: 163-168. IAEA-TECDOC-1055.
77. Samartino, L. Brucellosis: Nuevos retos en el control. Diagnóstico de la brucelosis animal. En actas del XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Palacio de Convenciones de La Habana, 18-22 de Noviembre 2002, pp. 24-33.
78. Samartino, L. Métodos convencionales de diagnóstico y su uso actual. Métodos de avanzada, sus aplicaciones y perspectivas. *Seminario-Taller de Zoonosis bacterianas de impacto para los países de América Latina*, 19-21 de Mayo 2004, p. 13-20.
79. Sánchez, I., Avilá, M., García, M. Importancia de la caracterización de cepas de

- Brucella* en la epidemiología y epizootiología de la enfermedad. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, Junio 1989, vol. 20, n° 2, p. 195-198.
80. Seoane, G., Toledo, M. Situación de la brucelosis bovina en Cuba. *Seminario-Taller Zoonosis bacterianas de impacto para los países de América Latina*. Sociedad Cubana de Microbiología Veterinaria, 19-21 de mayo 2004, p 12.
 81. Shoburhova, T.S., Tumanova, G.M., Nikolaeva, A.M., et al. The assessment of the parallelism in the results of measuring an analyzable substance and the calibrator in immunological assays. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*, Marzo-Abril 1999, vol. 2 (suplemento), p. 68-71.
 82. Splitter, G., Oliveira, S., Miller, C., et al. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Noviembre 1996, vol. 54, n° 1-4, p. 309-319.
 83. Stove, S., Welte, T., Wagner, F., et al. Circulating complement proteins in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Mayo 1996, vol. 3, n° 3, p. 175-183.
 84. Suárez, F. (2002): Control de la brucelosis animal y su repercusión en la bioseguridad alimentaria. En actas del XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Palacio de Convenciones de La Habana, 18-22 de Noviembre 2002. pp: 53-59.
 85. Uzal, F.A., Carrasco, A.E., Nielsen, K.H. (1996). Evaluation of a competitive ELISA for the diagnostic of bovine brucellosis. *Veterinary Research Communications*, Mayo 1996, vol. 20, n° 5, p. 421-426.
 86. Uzal, F.A., Carrasco, A.E., Echaide, S., et al. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in Patagonia, Argentina. En *Diagnosis and Epidemiology of Animal Diseases in Latin America*, IAEA in Austria, November 1998. pp: 69-76. IAEA-TECDOC-1055, ISSN 1011-4289.
 87. Vanzini, V.R., Aguire, N., Lugaresi, C.I., et al. Evaluation of an indirect in milk and serum simples in dairy cattle in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, Septiembre 1998, vol. 36, n° 3, p. 211-217.
 88. Vera, A., Seoane, G., Serrano, E., et al. Evolución de la brucelosis bovina en Cuba. Perspectivas. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, Abril 1999, vol. 25, n° 1, p. 3-7.
 89. Wright, F.P Normas internacionales sobre métodos y sueros de referencia para pruebas de diagnóstico por detección de anticuerpos. *Revue scientifique et technique Office international des Epizooties*, Agosto 1998, vol. 17, n° 2, p. 542-549.
 90. Wright, F.P., Nilsson, E., Van Rooj, E.M.A., et al. Standarization and validation of enzyme-linkend immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Revue scientifique et technique Office international des Epizooties*, Junio 1993, vol. 12, n° 2, p. 435-450.

REDVET® [Revista Electrónica de Veterinaria](http://www.veterinaria.org) (ISSN n° 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesinas, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> o en desde **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por [correo electrónico](mailto:redvet@veterinaria.org) solicitándolo a redvet@veterinaria.org

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Veterinaria Organización S.L.® - (Copyright) 1996-2007- E_mail: info@veterinaria.org